

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**Estudio de Diversidad Genética de *Callithrix pygmaea* en la Amazonía
Ecuatoriana mediante el uso de Microsatélites (SSR: Short Sequence
Repeats)**

Claudia Terán Egüez

Venancio Arahana, PhD, director de tesis

**Tesis de grado presentada como requisito
para la obtención del título de Licenciada en Biotecnología**

Quito, enero de 2013

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACION DE TESIS

Estudio de Diversidad Genética de *Callithrix pygmaea* en la Amazonía

Ecuatoriana mediante el uso de Microsatélites (SSR: Short Sequence

Repeats)

Claudia Terán Egüez

Venancio Arahana, Ph.D.

Director de la tesis y Miembro de Comité de Tesis

Stella de la Torre, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

Stella de la Torre, Ph.D.

Decano del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Quito, enero del 2013

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art.144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

Nombre: Claudia Terán Egüez

C. I.: 171047665-4

Fecha: 11 de enero de 2013

Agradecimientos

A mis padres y hermanos por todo su amor, apoyo y educación. Por acompañarme a través de tantas aventuras “across the universe”. Siempre alegres en buenos o malos momentos. Son un ejemplo para mí. Les quiero muchísimo.

A Daniel por todo su amor y por toda su ayuda superando momentos difíciles. Gracias por siempre hacerme reaccionar cuando lo he necesitado, para que no me de por vencida. Y por último gracias por todos los momentos felices junto a nuestros bebes perrunos. Mua!

Resumen

La especie *Callithrix pygmaea* pertenece a la familia Cebidae y a la subfamilia Callitrichinae. Los leoncillos son de pequeño tamaño, su pelaje es dorado oscuro y sus manos y pies similares a los de una ardilla. Habitan en bosques de galería de la Amazonía, en ciertos árboles de los cuales se alimentan de su exudado, insectos, frutas y flores. Debido a la alta intervención de la Amazonía por parte del ser humano, los leoncillos están siendo afectados por la fragmentación de los bosques. Poblaciones o grupos de leoncillos están aislados, impidiendo una dispersión regular de individuos entre grupos o poblaciones. Para poder estimar la vulnerabilidad de *C. pygmaea*, se realizó un estudio preliminar para evaluar la diversidad genética de esta especie en dos poblaciones (Sehuaya y Sacha). Se colectaron en total 46 muestras de heces de leoncillo, de las cuales 28 pertenecían a la población de Sehuaya y 18 a la población de Sacha. Además se colectaron 3 muestras de pelo de leoncillo de la población de Sehuaya. Las muestras de ADN a partir de pelo sirvieron como control positivo. Se amplificaron nueve regiones microsatélite con primers reportados para otra especie de Callitrichinos (Nievergelt, et al., 1998). Para realizar el análisis estadístico se incluyeron los datos colectados por Nieto et al. (2011) de la población de San Pablo. Los resultados obtenidos mostraron que existen hasta 3 alelos por locus analizado. El test de equilibrio de Hardy-Weinberg sugiere que en la población de Sehuaya puede haber endogamia. La heterocigosis observada fue generalmente más alta que la esperada mostrando que aún existe algo de diversidad genética en las poblaciones de Sacha y San Pablo. La prueba de AMOVA evidenció una diversidad genética más alta en una misma población que entre poblaciones, sugiriendo una baja migración de individuos entre poblaciones. La distancia genética de Nei fue de 0,168 entre las poblaciones de Sehuaya y Sacha, de 0,698 entre Sacha y San Pablo y de 2,124 entre Sehuaya y San Pablo. El análisis de coordenadas principales (PCA), mostró que podría haber flujo génico entre las poblaciones de Sehuaya y Sacha y entre Sacha y San Pablo. Este flujo génico puede deberse a la captura de individuos por parte de las personas de la región, los cuales facilitarían la “migración” entre poblaciones. Los resultados de este estudio presentan una realidad compleja para los leoncillos en cuanto a disminución de hábitat y diversidad genética. Por este motivo sería necesario realizar una investigación en la que se utilicen más pares de primers, para comprender mejor la situación genética de *C. pygmaea* y definir planes de conservación.

Abstract

Callithrix pygmaea belongs to Cebidae family and Callitrichinae subfamily. Pygmy marmosets have a small size, dark golden hair and hands and feet similar to those of a squirrel. They inhabit river edge forests of the Amazon. They feed on certain tree gum, insects, fruits and flowers. Over the last years, the Amazon has been occupied by the human being. The fragmentation of the forests has affected pygmy marmosets' regular migration between groups and populations. A preliminary study was conducted to estimate the vulnerability of *C. pygmaea* in two populations (Sehuaya y Sacha). 46 pygmy marmosets' feaces samples were collected, 28 of them belonged to Sehuaya population and 18 belonged to Sacha population. In addition, 3 pygmy marmosets' hair samples were collected from the Sehuaya population. The DNA samples extracted from hair follicle were used as positive controls. Nine microsatellite regions were amplified by PCR using primers reported for other Callitrichine species (Nievergelt, et al., 1998).). The results obtained by Nieto et al. (2011) in San Pablo population were also included in the statistical analysis. The results showed that each locus analyzed had a maximum of 3 alleles. The Hardy-Weinberg equilibrium test suggests that in Sehuaya population inbreeding could be occurring. Observed heterocigosity was usually higher than expected heterocigosity, showing that there is still some genetic diversity in Sacha and San Pablo. AMOVA test proved that the genetic diversiy within a population is higher than between populations. This makes clear that there is a low migration of individuals between populations. Nei's genetic distance was 0,168 between Sehuaya and Sacha, 0,698 between Sacha and San Pablo and 2,124 between Sehuaya and San Pablo. Principal coordinates analysis (PCA) showed that there might be genetic flow between Sehuaya and Sacha and between Sacha and San Pablo. This might have been caused by the capture of individuals by the people living in the area. This could facilitate the "migration" between populations. These results reveal a complex reality for pygmy marmosets because of their habitat reduction and low genetic diversity. For this reason, it would be necessary to carry out a broader study in which more primers are used, and in this way try to understand better *C. pygmaea*'s genetic situation and propose new conservation programs.

Tabla de Contenido

1.	Introducción	11
1.1.	La especie <i>Callithrix pygmaea</i>	11
1.1.1.	Generalidades	11
1.2.	Diversidad Genética	13
1.2.1.	Definición	13
1.2.2.	Impacto en las poblaciones	14
1.2.3.	Conservación de la diversidad genética	14
1.3.	Efectos de Fragmentación y Distancia	16
1.4.	Marcadores moleculares: Microsatélites	17
1.5.	Fuentes de Extracción de ADN	18
2.	Objetivo General	20
3.	Objetivos Específicos	21
4.	Justificación	21
5.	Área de estudio	23
6.	Materiales	23
6.1.	Recolección de Muestras de heces y pelos	23
6.2.	Extracción de ADN de heces:	24
6.3.	Extracción de ADN de pelo	24

6.4.	Electroforesis en gel de agarosa 1%	24
6.5.	Amplificación de ADN (PCR)	25
6.6.	Electroforesis en gel de poliacrilamida	25
7.	Métodos	26
7.1.	Recolección de muestras de heces y pelo de <i>C. pygmaea</i>	26
7.2.	Extracción de ADN a partir de heces de <i>C. pygmaea</i>	28
7.3.	Extracción de ADN a partir de pelo de <i>C. pygmaea</i>	29
7.4.	Electroforesis en gel de agarosa 1%	29
7.5.	Amplificación de ADN extraído de heces de <i>C. pygmaea</i> (mediante PCR).....	30
7.6.	Electroforesis en gel de poliacrilamida	30
7.6.1.	Preparación y arreglo de la cámara:.....	30
7.6.2.	Preparación del gel.....	31
7.6.3.	Tinción del gel	32
7.7.	Lectura de Geles de Poliacrilamida.....	33
7.8.	Análisis Estadístico	34
8.	Resultados	36
8.1.	Cuantificación de ADN.....	36
8.2.	Número de muestras estudiadas por población y por grupo.	36
8.3.	Extracción de ADN a partir de muestras de pelo	37

8.4. Amplificación de regiones microsatélite mediante PCR	37
8.5. Análisis Poblacional.....	38
9. Discusión	40
10. Conclusiones.....	49
11. Recomendaciones	49
12. Bibliografía	50
13. Tablas.....	53
14. Figuras	59
15. Anexos	67

1. Introducción

1.1. La especie *Callithrix pygmaea*

1.1.1. Generalidades

La especie *Callithrix pygmaea*, o leoncillo, pertenece a la familia Cebidae y a la subfamilia Callitrichinae (Cawthon, 2005). El género *Callithrix* se divide en tres grupos: *argenata*, representado por individuos que habitan la savana brasilera; *jacchus*, que habitan el bosque del Atlántico; y *pygmaea*, individuos del bosque Amazónico (Tagliaro, et.al., 2000).

La subfamilia Callitrichinae se destaca por ser útil en estudios sobre la evolución de estrategias de reproducción y sistemas sociales gracias a ciertos patrones vistos en esta subfamilia como: la ovulación post-parto, el desarrollo de gemelos, el cuidado cooperativo de los juveniles y sus sistemas de apareo flexibles. Los individuos de esta subfamilia se caracterizan también por tener garras en lugar de uñas en todos los dedos, excepto en el hallux. Estos individuos poseen dos molares, presentan un cuerpo pequeño y una gran variedad en la coloración del pelaje (Digby, et al., 2005).

Esta subfamilia ha sido estudiada más en profundidad durante los últimos 20 años. Los estudios de campo que han sido realizados en callitrichinos se basan en varios temas y han sido complementados con estudios de laboratorio. Algunos de estos estudios incluyen mapeo cognitivo, endocrinología reproductiva, contenido nutricional de la comida, filogenética, estudios biomédicos, entre otros (Digby, et al., 2005).

La especie *Callithrix pygmaea*, o leoncillo, puede diferenciarse de otros Callitrichinos por su pequeño tamaño, su abundante pelaje dorado oscuro y sus manos y pies similares a

los de una ardilla. El tamaño promedio de un adulto se encuentra en un rango entre 120 y 152 mm. Sin embargo, las hembras suelen ser aproximadamente 12% más pesadas que los machos (Townsend, 2001).

Los leoncillos habitan en bosques siempreverdes de tierras bajas inundables de la Amazonía de Colombia, Ecuador, Brasil, Perú y Bolivia. Estos bosques de galería se encuentran contiguos a ríos y se inundan en épocas de precipitación. Los leoncillos se encuentran generalmente en ciertos árboles como *Quararibea rhombifolia*, *Vochysia lomatophylla*, *Trichilia*, y *Spondias mombin*. Se alimentan principalmente de los exudados de los árboles antes mencionados y de artrópodos. Las frutas, flores y su néctar conforman una pequeña parte de su dieta. Al ser la abundancia de estas especies de árboles proporcional a la presencia y distribución de los leoncillos, su disponibilidad es esencial para la supervivencia de esta especie (Townsend, 2001).

1.1.2. Leoncillos en el Ecuador

El Ecuador se encuentra en zona tropical, es atravesado de norte a sur por la cordillera de los Andes, y la corriente fría de Humboldt pasa por sus costas. Estos factores definen una topografía única y una diversidad de climas y ecosistemas. Al este de los Andes, se encuentra la Amazonía por debajo de los 1300 m.s.n.m. (Muriel, 2008). Los leoncillos se encuentran en bosques de galería al noreste del territorio Ecuatoriano desde 220 a 450 m.s.n.m., cerca de los ríos Napo y Aguarico (de la Torre, et al., 2009).

Callithrix pygmaea es la especie de primate más pequeña que habita en el territorio ecuatoriano. Aunque todas las especies de primates en Ecuador están amenazadas por las

actividades humanas, *Callithrix pygmaea* es la más vulnerable. Esto se debe a su tamaño reducido, así como a la especificidad de su alimentación y hábitat (de la Torre, et al., 2005).

Dentro de su ecosistema, esta especie cumple funciones importantes al ser un polinizador (al alimentarse de néctar de flores), una presa (de algunas especies de reptiles, aves y mamíferos) y depredador (principalmente de insectos), por lo que su extinción generaría un desequilibrio importante en el ecosistema que habita. Por este motivo, la preservación de sus hábitats y el estudio de los impactos de las distintas formas de intervención, es importante para la conservación de esta especie (de la Torre, et.al., 2005).

1.2.Diversidad Genética

1.2.1. Definición

La diversidad genética es la variedad de alelos por gen en una especie. Diferencias en las secuencias que codifican los genes, pueden provocar cambios en las cadenas de aminoácidos, los cuales pueden causar diferencias funcionales, bioquímicas y morfológicas de las proteínas que se generan, afectando el comportamiento, las tasas de reproducción y supervivencia de una especie. Esta variedad de secuencias por gen, determina el polimorfismo de la especie. Mientras mayor sea el polimorfismo de una especie, mayor es su diversidad genética (Frankham, et al., 2002).

La diversidad genética es importante en el estudio de la biodiversidad, ya que las variaciones heredables en cada organismo de una población y entre las poblaciones de una especie, le confieren a ésta una ventaja evolutiva. Por este motivo, su conocimiento es vital para la conservación y avance de la genética evolutiva, así como en el desarrollo de

estudios de capacidad de respuesta de una población ante cambios ambientales o antropogénicos, de evaluación de riesgos de pérdida de especies, de análisis de poblaciones y sus recursos genéticos, en la elaboración de estrategias de conservación, análisis de la probabilidad de introducción de enfermedades, entre otros (de la Torre, et al., 2009).

1.2.2. Impacto en las poblaciones

Todas las poblaciones de especies silvestres tienen que enfrentarse a cambios ambientales, tales como la aparición de nuevas enfermedades, parásitos, plagas, depredadores, contaminación y cambios climáticos. Para que las poblaciones puedan superar estas situaciones extremas, tienen que evolucionar, lo cual requiere de una amplia diversidad genética. Por este motivo, las poblaciones grandes que tienen un sistema de apareamiento con individuos de otras poblaciones, poseen los beneficios de una gran diversidad genética, basados en la diferencia de reacciones entre individuos ante estas situaciones ambientales extremas (Frankham, et al., 2002).

Por otro lado, las poblaciones pequeñas tienden a tener poca diversidad genética. Esto se debe a que existe un mayor porcentaje de endogamia lo cual provoca un aumento en la frecuencia de ciertos alelos, una disminución en la frecuencia de otros alelos, y a veces hasta su desaparición. Estas poblaciones tienen una menor ventaja evolutiva y van a tener una mayor posibilidad de extinción (Frankham, et al., 2002).

1.2.3. Conservación de la diversidad genética

La estructura genética de poblaciones de monos y otras especies se ve normalmente afectada por factores intrínsecos, como patrones de agrupamiento, dispersión según sexos,

distancias de dispersión, deriva génica, entre otros. La estructura genética de las poblaciones puede también ser alterada por factores extrínsecos, como eventos geológicos/climáticos e interferencias antropogénicas, como la deforestación, y la fragmentación de hábitats, los cuales pueden cambiar la estructura de la población y su diversidad genética (Chaves, et al., 2011).

La extinción de algunas especies, así como la disminución de la población de otras, ha incentivado la toma de conciencia sobre el daño que causan las intervenciones humanas directa o indirectamente sobre el proceso evolutivo de estas especies. Por este motivo, algunas especies requieren de una intervención benéfica para poder asegurar su supervivencia. Con el fin de identificar las especies que necesitan esta ayuda, se utilizan marcadores genéticos que, combinados con parámetros demográficos en análisis de viabilidad poblacional, muestran la probabilidad de supervivencia de esta especie ante cambios ambientales (Frankham, et al., 2002).

Algunos estudios han demostrado que la desaparición de algunos grupos de leoncillos se debe a que sus hábitats habían sido ocupados por humanos. Existe evidencia que los leoncillos son muy sensibles a este tipo de intervención ya que el ruido del tráfico humano altera su comportamiento. La desaparición de grupos de leoncillos e incluso poblaciones, infiere sobre su diversidad genética, ya que varía la ubicación de los grupos y modifica los patrones migratorios entre grupos (de la Torre, et al., 2009).

Debido al alto índice de deforestación en la Amazonía ecuatoriana (150.000 ha/año), se ha propuesto que se incluya a *C. pygmaea* dentro de la lista de especies

vulnerables del Ecuador. También se ha promovido un programa de educación ambiental a niños de áreas cercanas a los hábitats de los leoncillos para incrementar conciencia acerca del daño que provoca la deforestación de estas áreas y la captura de individuos para ser vendido, como mascotas en pueblos aledaños (de la Torre, et al., 2009).

1.3.Efectos de Fragmentación y Distancia

La fragmentación de hábitats es la transformación de un área total continua en varios trozos de hábitat de menor tamaño al área total inicial, los cuales están aislados los unos de otros. Como consecuencia de esta fragmentación, pueden surgir cuatro efectos: reducción de la superficie de hábitat, aumento del número de fragmentos de hábitat, disminución del tamaño de los fragmentos de hábitat y aumento en el aislamiento de los fragmentos de hábitat. La reducción del área total de hábitat, resultado de la fragmentación, ocasiona no solamente la pérdida de hábitat, sino también un cambio en las propiedades del mismo (Fahrig, 2003).

Generalmente, la fragmentación de hábitats se da por la construcción de caminos y carreteras y la tala indiscriminada de bosques por parte de las madereras. La construcción de carreteras aumenta la erosión del suelo, la sedimentación y los derrumbes. Además, al transportar todo tipo de productos, puede facilitar la dispersión de especies invasoras y depredadoras de plantas y animales. Por otro lado, las carreteras también impiden el movimiento de especies sensibles, cambiando así las propiedades del hábitat inicial; además se eleva la mortalidad de los vertebrados terrestres como los anfibios, los cuales mueren atropellados tratando de cruzar estas carreteras. Por último, las carreteras promueven la expansión de asentamientos humanos, que traen consigo ruidos y

contaminación, los cuales perjudican a un ambiente previamente no intervenido (McGarigal, et al., 2001).

Esta situación afecta a todos los seres vivos que habitan estos territorios fragmentados. En el caso de los leoncillos, éstos se ven afectados por la alteración de su hábitat, el tráfico humano, el turismo y la captura de individuos. Además, en el estudio por de la Torre y colaboradores (2006) se encontró que del 75 al 85% de los bosques de galería habitados por leoncillos han sido afectados por la tala y la agricultura. Esto ha provocado una disminución en la densidad poblacional, alterando su comportamiento y sus patrones de reproducción.

1.4. Marcadores moleculares: Microsatélites

Los marcadores moleculares son genes o secuencias de ADN con un fenotipo fácil de identificar, por lo que células o individuos con diferentes alelos son diferenciables. Para ser un marcador molecular útil, debe tener ciertas características: debe ser polimórfico, una variación heredable en un locus; debe ser reproducible, es decir dar resultados similares en diferentes experimentos; preferiblemente co-dominante, para detectar heterocigotos y homocigotos; la detección del marcador debe ser rápida y económica; debe demostrar diferencias medibles en la expresión entre los alelos de interés; no puede tener efecto sobre el rasgo de interés que varía dependiendo del alelo en el locus del marcador; y por último, no puede haber interacción entre marcadores para poder utilizar varios marcadores al mismo tiempo (Kumar, 2001).

Uno de los marcadores moleculares más utilizados para estudiar la diversidad genética de especies son los microsatélites o SSR (simple sequence repeats en inglés). Éstos son regiones no codificantes del ADN, conformadas por motivos de 1 a 6 nucleótidos repetidos

en tándem (Olivieira, et al., 2006). Presentan herencia mendeliana simple y son codominantes, por lo que es posible diferenciar entre homocigotos y heterocigotos. El análisis de su genotipo es relativamente sencillo, fiable y repetitivo. Los microsatélites están presentes en todos los genomas eucariotas y en algunos procariotas. Su tasa de mutación varía de 10^{-2} y 10^{-5} por generación, lo cual explica su alto grado de polimorfismo; esto se debe a una acumulación de errores de la polimerasa durante el proceso de replicación del ADN (González, 2003). Debido a su alto índice de mutación, mayor a otras regiones del genoma, los microsatélites han sido utilizados para construir mapas genéticos, estudiar su relación con enfermedades genéticas, realizar estudios de genética de poblaciones y desarrollar exámenes genotípicos y de paternidad (Olivieira, et al., 2006).

1.5.Fuentes de Extracción de ADN

El “muestreo no invasivo” consiste en la recolección de células de una cierta especie a estudiar sin necesidad de manipular a los individuos; es una nueva forma de recolectar datos con un gran potencial para los biólogos. Muestras de pelos y heces son recogidas para extraer ADN y analizar poblaciones libres de diferentes especies, sin la necesidad de capturar ni observar a los individuos. Este método fue introducido en Europa con el objetivo de obtener muestras genéticas de osos poco visibles y para estudiar estructuras sociales en chimpancés. Sin embargo, este método de muestreo ha evidenciado ciertas debilidades, tales como una baja concentración de ADN en las muestras, contaminación con compuestos inhibidores de PCR y altos índices de error al momento de analizar genotipos a través de marcadores moleculares, como los microsatélites (Waits y Peatkau, 2005).

Generalmente en estudios de poblaciones, se utiliza otro tipo de material orgánico, como sangre o piel, para extraer ADN. Sin embargo, este es un método de muestreo invasivo, en el que es necesario capturar al animal y hacerle daño al pincharlo o extraerle una porción de tejido cutáneo, situación que podría interferir en futuros estudios de comportamiento. Al recoger material como pelo o heces, no se manipula al animal de ninguna manera y se evitan estos problemas (Alberts, et al., 2010).

Las dos fuentes de ADN más utilizadas, procedentes de muestreos no invasivos, son las heces y los pelos. En las heces, el ADN es extraído de las células epiteliales del intestino que han sido excretadas. El ADN extraído de esta fuente, generalmente contiene altas concentraciones de inhibidores de la PCR. Por este motivo, se han evaluado varios métodos para extraer el ADN de esta fuente, como el protocolo de fenol-cloroformo, magnetismo, kits comerciales de extracción, entre otros. Al momento, no se cuenta con un consenso acerca del método más eficaz, ya que puede variar dependiendo de la especie analizada o la región geográfica (Waits y Peatkau, 2005).

La extracción de ADN a partir de pelos de un individuo, se centra en extraer el material genético de las células presentes en la raíz del pelo. En los mamíferos, los pelos constituyen elementos epidérmicos queratinizados que cubren su cuerpo y cumplen funciones termoregulatoras y protectoras. Están compuestos por cuatro componentes: médula, cutícula, córtex y gránulos de pigmento, los cuales contienen melanina, que actúa como uno de los compuestos inhibidores de la PCR (Alberts, et al., 2010). Generalmente se utilizan dos métodos para la extracción de ADN a partir de muestras de pelo: un protocolo con Chelex y algunos kits comerciales de extracción de ADN específicos para la fuente de donde se

extrae. En el 2005, un estudio realizado por Waits y Peatkau evaluó estos dos métodos y comprobó que los kits comerciales son más eficientes, sin embargo existe una marcada diferencia entre los costos de las distintas metodologías.

El ADN extraído a partir de pelo o heces, puede ser utilizado en diversas investigaciones. El presente estudio analiza la diversidad genética en poblaciones de leoncillos. *C. pygmaea* es una especie de alta vulnerabilidad debido a su tamaño reducido y a su alta especificidad de dieta y hábitat. Por esta razón y por la alta intervención que sufre actualmente su hábitat, es necesario realizar estudios acerca de su diversidad genética para que este análisis permita en un futuro realizar planes de conservación de esta especie. Este estudio preliminar se evaluó la diversidad genética de dos poblaciones de leoncillos (Sehuaya y Sacha) al noreste del territorio ecuatoriano, para lo cual se usó nueve pares de primers que amplificaron microsatélites. Se utilizó el mismo método de amplificación que empleó Nieto et al. (2011). Se hizo un análisis estadístico con los resultados obtenidos con cada amplificación. Se determinó la frecuencia alélica, la heterocigosis, el equilibrio Hardy-Weinberg, la distancia genética de Nei, el análisis molecular de variancia y un análisis de coordenadas principales.

2. Objetivo General

Evaluar, en forma preliminar, la diversidad genética existente en 2 poblaciones de *Callithrix pygmaea* en el oriente ecuatoriano mediante el análisis del ADN de muestras de pelo y heces a través de microsatélites.

3. Objetivos Específicos

- Estandarizar un protocolo de extracción de ADN a partir de muestras de pelo de *C. pygmaea*.
- Determinar el nivel de polimorfismo existente en dos poblaciones de leoncillos: Sehuaya y Sacha, mediante la amplificación de regiones microsatélite del ADN extraído a partir de muestras de heces y de pelo de leoncillos, éste último utilizado como control positivo.
- Relacionar la diversidad genética de las poblaciones de leoncillos de Sehuaya y Sacha con la población de San Pablo, previamente estudiada por Nieto y colaboradores en el año 2011, utilizando la misma metodología que éste estudio y los mismos primers que amplifican regiones microsatélite.

4. Justificación

Ecuador es un país en el que muchos factores, como la Cordillera de los Andes, la corriente fría y seca de Humboldt y su posición en la zona tropical, hacen que exista una gran variedad de climas y ecosistemas con una biodiversidad única. La región amazónica, ubicada al este del país, cubre casi el 50% del territorio ecuatoriano. Su clima es húmedo (≥ 2000 mm de precipitaciones anuales) y su vegetación es característica de los bosques de galería de tierras bajas (Muriel, 2008).

En los últimos años, muchos de estos bosques han sido talados. La agricultura, la ganadería, las empresas madereras y las petroleras han sido la causa del incremento de asentamientos humanos en la Amazonía ecuatoriana. Todos estos factores han provocado la

deforestación de los bosques, lo cual repercute en todo el ecosistema a través de una serie de consecuencias que lo alteran.

- Se produce una degradación del hábitat, debido a las carreteras que fragmentan los bosques y afectan su composición y microclima.
- La disminución del hábitat ocasiona una pérdida de biodiversidad.
- Se modifica el clima global, ya que se reduce la absorción de dióxido de carbono.
- Hay impactos sociales porque la disminución de bosques provoca que las personas no se puedan beneficiar de los recursos naturales.

Los primates de la especie *Callithrix pygmaea* que habitan en la región Amazónica del Ecuador, corren un gran riesgo de desaparecer debido al impacto que han tenido las actividades humanas sobre su hábitat. Como se mencionó anteriormente, en los últimos años los seres humanos han invadido y deforestado grandes áreas de la selva amazónica en las que existe una gran biodiversidad tanto vegetal como animal. La fragmentación de los bosques ha provocado la desaparición y muerte de individuos de muchas especies, entre ellas los leoncillos (de la Torre, et.al., 2009). Actualmente *Callithrix pygmaea* está clasificada como una especie “vulnerable” a la extinción según el Libro Rojo de especies del Ecuador (Tirira, 2011).

Este es un estudio preliminar, que provee información clave para investigaciones posteriores de *Callithrix pygmaea*. Además, complementa al estudio de Nieto et al. (2011), porque se hace un análisis de la diversidad genética de dos poblaciones de leoncillos (Sehuaya y Sacha) y se compara los resultados obtenidos en ese momento con los del

presente estudio. La importancia de la información obtenida radica en que es de gran utilidad para determinar la evolución de las poblaciones de Sehuaya, Sacha y San Pablo, y conocer cómo interaccionan y se relacionan los individuos de estas poblaciones. Además, la identificación de la diversidad genética de esta especie en el Ecuador es importante para elaborar programas de conservación que sirvan para prevenir la desaparición de grupos y poblaciones de leoncillos en la Amazonía ecuatoriana.

5. Área de estudio

Este proyecto analiza la diversidad genética de 2 poblaciones de leoncillos (*Callithrix pygmaea*) ubicadas a orillas del río Aguarico, en la provincia de Sucumbíos al noreste de la amazonía ecuatoriana. Una de ellas es la población de Sehuaya (coordenadas UTM, zona 18, datum WGS84, 357068 E, 9971787 S), con dos grupos (S1 y S2), cuyas muestras fueron recolectadas en Agosto del 2010. Otra es la población de Sacha, ubicada en la provincia de Orellana (coordenadas UTM, zona 18, datum WGS84, 336428 E, 9946884 S), con dos grupos (Sa1 y Sa2), cuyas muestras fueron recolectadas en Marzo del 2011. El análisis de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ).

6. Materiales

6.1. Recolección de Muestras de heces y pelos

- Población de Sehuaya:

- Grupo 1 (Nomenclatura S1): 13 muestras de heces y 3 muestras de pelos de *C. pygmaea*.
- Grupo 2 (Nomenclatura S2): 15 muestras de heces de *C. pygmaea*.
- Población de Sacha:
 - Grupo 1 (Nomenclatura Sa1): 9 muestras de heces de *C. pygmaea*.
 - Grupo 2 (Nomenclatura Sa2): 9 muestras de heces de *C. pygmaea*.

6.2.Extracción de ADN de heces:

- QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen)
- NANODROP 1000 (Thermo Scientific)

6.3.Extracción de ADN de pelo

- Muestras de pelo de leoncillo
- Buffer: Resina Chelex100 (5 g), Polyoxyethylene 10 Lauryl Eter (0.9 g), Tris-HCl (1 ml) y agua (hasta completar 100 ml).
- Proteinasa K
- DTT: Dithiothreitol (7 umol)
- Vortex (Lab Dancer VWR)
- Microcentrífuga (Eppendorf)
- Incubadora (Thermo Scientific)

6.4.Electroforesis en gel de agarosa 1%

- Agarosa 1%
- TBE 1X: Tris Base (10,8 g/L), Ácido Bórico (5,5 g/L), EDTA (0,744 g/L).

- ADN de *Callithrix pygmaea*
- Blue Juice (Invitrogen)
- Cámara de electroforesis (Labnet)
- Syber-green (Invitrogen)
- Ladder (Invitrogen)

6.5. Amplificación de ADN (PCR)

- ADN extraído de heces y pelo de *Callithrix pygmaea*
- Primers (Anexo 1)
- Taq polimerasa (Invitrogen)
- dNTPs (Invitrogen)
- Agua de PCR (Invitrogen)
- Termociclador (Biometra)

6.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida

- ADN de heces y pelo de *Callithrix pygmaea* producto del PCR
- Cámara de electroforesis vertical (Bio-Rad)
- Alconnox
- Etanol 96%
- RAIN-X
- Bind silane (3- Methacryloxypropyltrimethoxysilane)
- Acrilamida 6%: Agua deionizada (40%), Acrilamida (57g/L), Bisacrilamida (3g/L), TBE 10X (10%), Úrea (300,3 g/L).

- Persulfato de amonio 10%
- UltraPure™ Temed (Invitrogen)
- Ladder 10 bp (Invitrogen)
- TBE 1X (Tris Base, Ácido Bórico, EDTA)
- Solución fijadora y de parada: Ácido Acético glacial MERCK (0,05 mL), Alcohol absoluto (10 mL), Agua Deionizada 89,95 mL.
- Solución de Tinción: Nitrato de Plata 4g (FISHER), Formaldehído 37% 3ml (MERCK), volumen final 2000ml con agua deionizada.
- Blue juice (INVITROGEN)
- Nitrato de plata 2 g/L
- Agua deionizada
- Solución reveladora: Hidróxido de Sodio 30g (MERCK), Formaldehído 37% 4ml (MERCK) y volumen final 2000ml con agua deionizada.

7. Métodos

7.1.Recolección de muestras de heces y pelo de *C. pygmaea*.

Las muestras de heces fueron colectadas en trampas colocadas bajo los árboles de exudado de cada grupo. Las trampas consistían en mallas de polisombra, extendidas horizontalmente alrededor de cada árbol, a una altura aproximada de un metro. Las heces fueron colectadas a lo largo de todo el día por 1-2 investigadores quienes realizaron observaciones de comportamiento (presupuesto de tiempo diario, comportamientos afiliativos y alimenticios) en cada grupo. Se recolectaron 28 muestras en la población de Sehuaya (13 del grupo S1 y

15 del grupo S2), y 18 muestras en la población de Sacha (9 del grupo Sa1 y 9 del grupo Sa2). En todos los grupos, las muestras de heces provinieron de al menos 3 individuos de cada grupo (con excepción del grupo 2 de la población Sehuaya que tenía solo dos individuos), aun cuando no fue posible asignar con certeza el individuo del que provenía cada muestra. Cada muestra de heces fue recolectada en tubo Eppendorf de 1,5 ml con etanol 97%. Las muestras fueron luego transportadas a Quito y almacenadas en refrigeración en el laboratorio de Biotecnología Vegetal en la Universidad San Francisco de Quito, para luego ser procesadas en el mismo.

Las 3 muestras de pelos fueron recolectadas usando otra metodología. En el área de vida de los dos grupos de Sehuaya, se colocaron trampas de velcro y alambre. Estas trampas tenían la forma y tamaño de un zapato de alambre sin talón, rodeado internamente por tiras de velcro. En el interior del zapato (hacia la punta), se colocó un pedazo de plátano como cebo. Las trampas fueron colgadas en la vegetación aledaña al principal árbol de exudados de cada grupo, a una altura aproximada de 5m. Generalmente, los leoncillos inspeccionaban las trampas 1-2 días después de que éstas eran colocadas. Una vez que algunos individuos se familiarizaban con ellas, éstos entraban en el zapato para comer el plátano y el velcro recolectaba pelos de diversas partes del cuerpo. Estos pelos fueron recolectados inmediatamente después de que un leoncillo salía de la trampa y fueron almacenados en tubos Eppendorf de 1,5 ml con etanol 96% para ser luego transportados al Laboratorio de Biotecnología Vegetal en la Universidad San Francisco de Quito.

7.2.Extracción de ADN a partir de heces de *C. pygmaea*.

Se siguió el protocolo mencionado en el manual del kit de extracción QIAamp stool mini kit (Qiagen). Primero se descartó el etanol del tubo que contenía las muestras de heces. A continuación se colocó 1.6 ml del buffer ASL de lisis celular en cada muestra y se homogenizó con la ayuda del vortex. Para separar las heces del buffer (que contenía las células lisadas), se centrifugó durante un minuto a 13000 rpm. Se pipeteó 1.4 ml del sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf, en el cual se colocó una tableta InhibitEX que adsorbe los inhibidores de PCR, y se incubó a temperatura ambiente por un minuto. A continuación se centrifugaron las muestras y se pipeteó todo el sobrenadante a un nuevo tubo que fue centrifugado nuevamente para descartar cualquier residuo de la tableta InhibitEX. Posteriormente se extrajeron 600 µl del sobrenadante y se lo colocó en un nuevo tubo Eppendorf que contenía 25 µl de Proteinasa K. Se añadieron 600 µl de buffer AL y se dejó incubar a 70 °C durante 10 minutos. A continuación se añadieron 600 µl de etanol 97% y se homogenizó por vortex. De esta mezcla se pipetearon 600 µl sobre una columna QIAamp y se centrifugó por un minuto. Este proceso se repitió dos veces más. A continuación se añadieron 500 µl de buffer AW1 de lavado y se centrifugó por 1 minuto. Este proceso se repitió con el buffer AW2. Finalmente se colocó la columna en un tubo Eppendorf y se añadieron 200 µl del buffer AE que es el buffer de elución, en el que se conservó el ADN extraído. Cada muestra tenía una concentración diferente de ADN, la mayoría menor a 10 ng/ul. Las muestras que tenían una concentración mayor a 10 ng/ul, se les diluyó para que su concentración final sea 10 ng/ul.

7.3.Extracción de ADN a partir de pelo de *C. pygmaea*.

Se cortaron 15 pelos por muestra, lo más próximo posible a la raíz y se los colocó en 200 uL de buffer de lisis, el cual contiene Polyoxyethylene 10 Lauryl Eter (0.9 g), Chelex 100 (5 g), Tris HCl (1 ml) y agua (hasta completar 100 ml). La función de este buffer es lisar a las células de los folículos capilares. Después se agregaron 20 ug de proteinasa K y 7 umol de DTT, los mismos que funcionan como inhibidores de nucleasas. Se homogenizó la muestra mediante un vortex y se la incubó a 56°C durante 4,5 horas, tiempo en el cual actúa la proteinasa K. A continuación se mezcló con vortex y se incubó la muestra por 8 minutos a 100°C para inactivar la proteinasa K y el DTT. Se realizó una última agitación y finalmente se centrifugó la muestra a 10,000 rpm por 1 minuto para separar la resina del ADN (Bjornerfeldt y Vila, 2006). Una vez centrifugada la muestra, se retiró el líquido sobrenadante que contiene el material genético, y se desechó el chelex en el fondo del tubo Eppendorf. Por último se cuantificó la concentración de ADN de cada muestra. Las muestras se guardaron en un congelador a -20°C del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito.

7.4.Electroforesis en gel de agarosa 1%

Se preparó un gel de agarosa al 1%, se añadieron 5 ml de TBE 10X a una probeta y se aforó con agua destilada hasta alcanzar 50 ml. Después se añadieron 0,5 g de agarosa que fueron disueltos en el horno microondas durante 1 minuto. Cuando se enfrió la mezcla, se colocaron 2 ul de syber-green, se preparó la cámara de electroforesis y se añadió la solución. Se esperó alrededor de 15 minutos para que se gelifique.

Para colocar las muestras de ADN en los pocillos, primero se mezcló a cada una de ellas con buffer de carga sobre un pedazo de parafilm. Se colocaron 5 uL de ADN y 1 uL de buffer de carga. Se corrió el gel durante 30 minutos a 90 watts si se trataba de ADN extraído, y 1 hora a 90 watts si se trataba de ADN amplificado. Al finalizar, se retiró el gel de la cámara y se le tomó una foto con luz UV para poder analizar las bandas obtenidas.

7.5. Amplificación de ADN extraído de heces de *C. pygmaea* (mediante PCR)

En este estudio se utilizaron 9 pares de primers que amplifican microsátélites de *Callithrix jacchus*, los cuales se desarrollaron mediante clonación y son específicos para esta especie (Anexo 1) (Nievergelt, et al., 1998). La amplificación de ADN de leoncillo se la realizó con el método previamente estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito (Nieto, et al., 2011). En un volumen final de 25 µL, se disolvió buffer de PCR 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de dNTP's, 0,24 µM de cada primer, 0,5U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 5ng de ADN. Los primers utilizados fueron los mencionados en Nievergelt et al. (1998), que en un principio fueron establecidos para *C. jacchus*, una especie muy cercana a *C. pygmaea*. En el presente estudio se utilizaron dos muestras de ADN extraído a partir de muestras de pelo de *C. pygmaea* como controles positivos en cada amplificación de ADN extraído a partir de muestras de heces.

7.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida

7.6.1. Preparación y arreglo de la cámara:

Los vidrios fueron lavados dos veces con alconnox y se los dejó escurrir. A continuación se limpió con etanol 95%. El mismo tratamiento se le dio a la cámara.

Se vertió sobre el vidrio ensamblado en la cámara 1 mL de RAIN-X, se lo distribuyó uniformemente y se dejó secar por 5 minutos, se repitió este paso dos veces más. Los espaciadores se limpiaron con etanol 95% y se colocaron sobre el vidrio.

Para dejar listo el vidrio donde se iba a pegar el gel, primero se preparó bind silane: en un tubo eppendorf de 1,5 mL se colocó 1mL de stock (etanol 95% - ácido acético 0,5%) y 3 uL de bind silane. Se vertió esta solución sobre el vidrio cubriéndolo por completo y se dejó secar por 5 minutos.

Para armar la cámara se colocó el vidrio sobre la cámara y se ajustaron los brazos cerrando las palancas de los brazos simultáneamente. Después se colocó la base de la cámara y se ajustaron las palancas.

7.6.2. Preparación del gel

El gel de acrilamida se preparó mezclando 100 mL de acrilamida 6% (Agua deionizada (40%), Acrilamida (57g/L), Bisacrilamida (3g/L), TBE 10X (10%), Úrea (300,3 g/L)), 545 uL de persulfato de amonio 10% y 109 uL de Temed. Se colocó esta mezcla en una jeringa eliminando las burbujas. Se acopló la jeringa a la manguera conectada a la cámara y se inyectó la mezcla de acrilamida uniformemente. Después se introdujo el peine entre los vidrios para crear el frente de corrida y se presionó con ganchos. Se dejó reposar durante 1 hora para que el gel se polimerice.

Antes de colocar las muestras en los pocillos del gel se realizó una pre-corrida. Para esto se prepararon 1.5 litros de TBE 1X que fueron calentados en el horno microondas por 5 minutos. Se quitó la base al gel polimerizado y se colocó sobre la base el buffer y se ajustó

la cámara. Se agregó TBE en la base y adentro de la cámara. Se quitó el peine, se eliminó la urea y restos de acrilamida. Se introdujo de nuevo el peine en el gel del lado contrario (con las puntas hacia adentro). Se colocaron 3 uL de buffer de carga en varios pocillos del gel. Se realizó la pre-corrída del gel a 80 watts por 15 minutos. En esta etapa se pudo evidenciar los pocillos que estaban bien formados y sin fuga y se planificó el orden de carga de las muestras.

Para la corrida de las muestras, se mezclaron 5 uL de producto de PCR con 1 uL de Blue Juice (Invitrogen). Se denaturó la mezcla durante 6 minutos a 95°C. Se centrifugó a 13000 rpm para recoger la muestra condensada a los lados de los tubos. Se detuvo la pre-corrída del gel y se colocaron 5 uL de cada muestra en cada pocillo del gel. Se añadieron 3 uL de ladder 10 pb en los pocillos a los extremos. Se corrió a 80 watts por 3 horas. Cuando la muestra entró en el gel (a los 10 minutos de corrida) se sacó el peine. Cuando culminó el tiempo de corrida se eliminó el TBE y se desarmó la cámara.

7.6.3. Tinción del gel

Para la tinción del gel se siguió el protocolo de Benbouza et al (2006). Se colocó el vidrio al cual estaba adherido el gel en una bandeja con solución fijadora (ácido acético 0,05 mL, alcohol absoluto 10 mL y agua deionizada 89,95 mL) durante 5 minutos. Se colocó el gel en otra bandeja con solución de tinción durante 7 minutos en oscuridad moviendo la bandeja constantemente. Se lavó el gel por 8 segundos en una bandeja con agua de-ionizada moviéndola suavemente. A continuación se colocó el gel en la solución reveladora y se movió el gel hasta la aparición de las bandas. Una vez teñido el gel, se lo colocó de nuevo en la solución fijadora (que actúa como solución stop) durante 3 minutos.

Se enjuagó el gel con agua de-ionizada, hasta eliminar el ácido acético. Se esperó a que se seque el gel y se escaneó la imagen del mismo para analizar los resultados.

7.7.Lectura de Geles de Poliacrilamida

Una vez teñido el gel de poliacrilamida, se lo colocó en un transiluminador de luz blanca para identificar adecuadamente las bandas para su análisis. Con la ayuda de una regla graduada en milímetros, se midió la distancia desde el frente de corrida a cada una de las bandas del ladder 10 pb. A continuación se midió la distancia desde el frente de corrida hasta cada una de las bandas de las muestras de ADN de leoncillo que correspondían a los alelos.

La lógica utilizada para identificar alelos obedeció a los siguientes criterios:

- Que la banda en el gel esté en el rango de pb proporcionado por el artículo de Niervergelt y colaboradores (1998).
- Que cada alelo contenga dos bandas, correspondientes al ADN denaturalizado que se cargó en los geles.
- Que cada alelo, con su correspondiente par de bandas, se repita mínimo 2 veces en el gel, esto es, en distintos individuos de la población.

Después se realizó una tabla en Excel que contenía la distancia en mm y el número de pares de bases de cada banda del ladder y se realizó un gráfico que correspondía a una regresión lineal. Con la ecuación de la regresión lineal se obtuvo el peso de cada alelo en pares de bases.

7.8. Análisis Estadístico

Para analizar estadísticamente los datos obtenidos en los geles de poliacrilamida, se realizó un análisis de genotipos de las muestras que amplificaron con los primers CJ-7, CJ-11 y CJ-13, ya que los loci CJ-12 y CJ-14 resultaron ser monomórficos. Las muestras que presentaron alelos iguales en los 3 loci, fueron consideradas como un mismo individuo.

A continuación se realizó una matriz en la que constaban los diferentes genotipos de cada población, confrontados con el número de individuos de cada grupo (el número de genotipos debió ser siempre igual o menor al número de individuos en un grupo), y con los alelos de cada genotipo en cada locus amplificado. Esta matriz, permitió realizar el análisis estadístico de los resultados a través del programa GenAlex 6.41 (Peakall y Smouse, 2006). Debido a que los resultados obtenidos para las poblaciones de Sacha y Sehuaya no eran fiables por la baja cantidad de muestras, se añadieron al análisis estadístico los genotipos encontrados en la población de San Pablo en un estudio previo realizado con los mismos loci por Nieto et al. (2011). Esta población constó de tres grupos: P1, P2 y P4. El grupo P1 y P2 con 3 individuos cada uno y el grupo P4 con 8 individuos.

De esta manera se pudieron realizar los siguientes análisis:

- Frecuencias alélicas:

Este análisis realizado por locus, también se puede determinar por conteo directo de la proporción de los diferentes alelos en un locus (Peakall y Smouse, 2010).

- Equilibrio de Hardy-Weinberg:

Permite determinar si la frecuencia genotípica en un locus de una población es consistente con lo esperado en el modelo de equilibrio Hardy-Weinberg. Se determinó la frecuencia alélica, el valor de Ji-cuadrado y los grados de libertad (gl). Si la probabilidad de obtener el valor de Ji-cuadrado es mayor a 0.05, el resultado no es significativo estadísticamente, por lo que se dedujo que la población está en equilibrio Hardy-Weinberg (Peakall y Smouse, 2010).

- AMOVA (Analysis of Molecular Variance):

Permite distinguir la variación genética entre poblaciones y en una misma población. Este análisis permite trabajar con diferentes tipos de marcadores genéticos (Peakall y Smouse, 2010).

- Distancia genética de Nei:

Ayuda a calcular la distancia genética entre poblaciones utilizando sets de datos co-dominantes, binarios o haploides (Peakall y Smouse, 2010).

- Análisis de Coordenadas Principales (PCA):

Permite encontrar patrones genéticos. En este proceso, los ejes principales de variación están localizados dentro de un set de datos multidimensional (Peakall y Smouse, 2010).

- Heterocigosis observada y esperada:

La heterocigosis observada se calcula en cada locus. El número de heterocigotos observados es determinado por cuenta directa. Para determinar la heterocigosis esperada se debe primero determinar las frecuencias alélicas (Peakall y Smouse, 2010).

8. Resultados

8.1. Cuantificación de ADN

Después de cada extracción de ADN, se realizaron cuantificaciones mediante el equipo NANODROP 1000 (ThermoScientific) para determinar la concentración de cada muestra y su pureza. En la población de Sehuaya se obtuvo una concentración de ADN promedio de 10,44 ng/ul para todas las muestras de ADN extraídas del grupo 1 (S1) y de 3,55 ng/ul para todas las muestras de ADN extraídas del grupo 2 (S2). De S1 se utilizaron 7 muestras. De S2 se utilizó únicamente 1 muestra con una concentración de ADN de 14,8 ng/ul. En el resto de muestras la concentración fue muy baja y el ADN presente se encontró degradado, como se pudo evidenciar en un gel de agarosa al 1% (Figura 1 y 2). En la población de Sacha (Tabla 2) se obtuvo una concentración de ADN promedio de 4,3 ng/ul en el grupo 1 (Sa1) y de 3,8 ng/ul en el grupo 2 (Sa2). Esta población tuvo una concentración baja de ADN, sin embargo, todas las muestras dieron resultados visibles en un gel de agarosa al 1% (Figura 3).

8.2. Número de muestras estudiadas por población y por grupo.

En la población de Sehuaya, se trabajó con 7 muestras de ADN en el grupo S1 y tan solo 1 muestra de ADN para el grupo S2. Esto se debió a que en las otras 6 muestras colectadas de S1 y las 14 muestras de S2, bien presentaron una cantidad de ADN insuficiente para obtener una amplificación por PCR convencional, o el ADN presente se encontraba degradado. De las 7 muestras de ADN de S1, se encontraron tan solo 3 genotipos. Por lo que en la población de Sehuaya se trabajó con 4 individuos.

Por otro lado, en la población de Sacha se obtuvieron 18 muestras de ADN a partir de heces, 9 pertenecientes al grupo 1 (Sa1) y 9 al grupo 2 (Sa2). Todas las muestras de la población de Sacha fueron utilizadas para el presente estudio, pues presentaron cantidades de ADN suficientes para amplificar por PCR convencional las regiones blanco. El análisis de los genotipos de esta población evidenció 5 genotipos únicos para Sa1, y 6 genotipos únicos para Sa2. De estos resultados se puede estimar que en la población de Sacha se trabajó con 5 individuos de Sa1 y 6 individuos de Sa2.

8.3.Extracción de ADN a partir de muestras de pelo

Además de las muestras de ADN extraídas a partir de heces, se realizó una estandarización del método de extracción de ADN de pelo de leoncillo para utilizarlo como control positivo en las amplificaciones con los diferentes primers. Se obtuvieron concentraciones bajas de ADN (Tabla 3). Sin embargo se obtuvieron buenos productos de amplificación mediante PCR (Figura 4).

8.4.Amplificación de regiones microsatélite mediante PCR

Se amplificaron regiones microsatélite de todas las muestras de ADN, 18 muestras de los dos grupos de Sacha y 8 muestras de los dos grupos de Sehuaya, con 9 pares de primers: CJ-1, CJ-6, CJ-7, CJ-10, CJ-11, CJ-12, CJ-13, CJ-14 y CJ-15 (Anexo 1) (Nievergelt, et al., 1998). Sin embargo, los únicos primers con los que se obtuvo resultados positivos fueron CJ-7, CJ-11, CJ-12, CJ-13 y CJ-14. De éstos, los primers CJ-12 y CJ-14 generaron bandas monomórficas para todas las muestras. Se puede observar el resultado de las amplificaciones realizadas y corridas en un gel de poliacrilamida en las Figuras 5, 6 y 7.

Para realizar el análisis estadístico, primero se descartaron las muestras que tenían el mismo genotipo en los loci amplificados no monomórficos (CJ-7, CJ-11 y CJ-13) por considerar que provenían del mismo individuo (Tabla 4). Así, en la población de Sacha quedaron 5 muestras en Sa1 y 6 en Sa2; en la población de Sehuaya quedaron 3 genotipos en S1, y en S2 quedó una única muestra con un genotipo.

Como se mencionó anteriormente, para el análisis estadístico se incluyeron los resultados obtenidos en el estudio realizado por Nieto et al. (2011). A los resultados de la población de San Pablo también se les realizó un análisis de genotipos, descartando las muestras que tenían el mismo genotipo por considerarlas provenientes del mismo individuo (Tabla 3). De esta forma, se obtuvieron 8 individuos en el grupo 4 (SP4), y las muestras existentes en los grupos 1 (SP1) y 2 (SP2) quedaron intactas (3 individuos en cada grupo).

8.5. Análisis Poblacional

En el análisis de frecuencia alélica (Tabla 5) se determinó la proporción de los alelos en cada locus. En cada población la frecuencia de los alelos fue distinta. En la población de Sehuaya se obtuvo 1 alelo en el locus CJ-7, 1 en CJ-11, 2 en CJ-13, 1 en CJ-14 y no hubo amplificación en CJ-12. En Sacha por el contrario se obtuvieron 8 alelos en las 5 regiones microsatélite: 2 alelos en el locus CJ-7, 3 en CJ-11, 1 en CJ-12, 2 en CJ-13 y 1 en CJ-14. Por último en San Pablo, se encontraron 6 alelos en 3 regiones microsatélite de las 5 analizadas: 2 alelos en CJ-7, 2 alelos en CJ-11 (uno de ellos es privado para esta población) y 2 en CJ-12 (uno de ellos es único para esta población) y no hubo amplificación en CJ-13.

En el análisis de heterocigosis (Tabla 6), se comparó la heterocigosis observada a la esperada. En Sehuaya se encontró una heterocigosis observada mayor a la esperada en el locus CJ-13, los otros loci tuvieron resultados monomórficos. En Sacha, los loci CJ-7 y CJ-13, tuvieron una heterocigosis observada más alta que la esperada, con valores de 0,375 y 0,222 respectivamente. En el locus CJ-11 ocurrió lo contrario, no hubo heterocigosis, mientras que la heterocigosis esperada era de 0,278. En la población de San Pablo hubo resultados positivos en los loci CJ-7 y CJ-11 con valores de 0,667 y 0,333 mayores a los esperados, mientras que en el locus CJ-12 la heterocigosis observada fue 0.

El análisis de Hardy-Weinberg (Tabla 7) tuvo resultados similares en las poblaciones de Sehuaya y Sacha. Las dos tuvieron resultados monomórficos en los loci CJ-12 y CJ-14, por lo que no están en equilibrio Hardy-Weinberg. En los loci CJ-7 y CJ-13 las dos poblaciones están en equilibrio Hardy-Weinberg, con valores p de 0,292 en el locus CJ-7 en ambas poblaciones y de 0,637 y 0,708 en el locus CJ-13 en Sehuaya y Sacha respectivamente. Esto no sucede en el locus CJ-11, en donde p disminuye a 0,014 tanto en Sehuaya como en Sacha, lo cual sugiere que en las dos poblaciones este locus no está en equilibrio. La población de San Pablo por el contrario, se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg en los loci CJ-7 y CJ-11 con valores p de 0,221 y 0,624 respectivamente, mientras que en CJ-12 no existe equilibrio, ya que p es 0.

En cuanto al análisis de varianza molecular (AMOVA) (Tabla 8), se determinó que entre las poblaciones existe una varianza del 42%, mientras que en una misma población hay una varianza del 58%.

En el análisis de la distancia genética de Nei (Tabla 9), se obtuvo una distancia de 0,168 entre las poblaciones de Sacha y Sehuaya, de 0,698 entre Sacha y San Pablo. Entre Sehuaya y San Pablo se evidencia la mayor distancia con un valor de 2,124. Esto se corrobora en los análisis de coordenadas principales (Figura 5), en el cual se puede visualizar que la población de Sacha tiene bastantes similitudes con San Pablo y Sehuaya. Sin embargo, la población de San Pablo se encuentra agrupada en dos grupos alejados de los individuos de Sehuaya.

9. Discusión

Este estudio consistió de dos partes: la estandarización del método de extracción de ADN a partir de muestras de pelo de *C. pygmaea* y el análisis de diversidad genética de *C. pygmaea* mediante la amplificación por PCR de regiones microsatélite de ADN extraído a partir de muestras de heces junto con un par de muestras de ADN extraídas a partir de muestras de pelo, usadas como control positivo.

Para la extracción de ADN a partir de muestras de pelo se estandarizó un protocolo con Chelex, una resina que protege el ADN durante el proceso a altas temperaturas. Este método es generalmente utilizado para la extracción de ADN a partir de un número reducido de células (Bjornerfeldt y Vila, 2006), como es el caso del folículo capilar. Como se puede apreciar en la Tabla 3, al utilizar 15 pelos por extracción se obtiene una concentración alta de ADN. Mediante un estereomicroscopio, se pudo observar que no todos los pelos recolectados tienen folículo. Dado que la concentración de ADN dependió de la cantidad de células en el folículo capilar, al inicio del estudio se consideró pertinente

extraer material genético únicamente de aquellos pelos que presenten folículo. Sin embargo, los pelos de los leoncillos son muy finos y su manipulación es complicada, por lo que ese proceso resultó infructuoso. Por este motivo, se resolvió estandarizar el proceso utilizando 15 pelos tomados al azar. De esta manera, se obtuvo en promedio una concentración de 21,35 ng/ul de ADN. En la misma Tabla 3 se observa una concentración mínima de 9,2 ng/ul y una concentración máxima de 47,1 ng/ul. Este rango de concentración de ADN, puede ser útil para lograr amplificaciones exitosas mediante PCR. El gran beneficio de estas muestras de ADN para la presente investigación, es que existe la certeza de que son de *C. pygmaea*, mientras que las muestras de ADN extraídas a partir de heces, contienen ADN de otras especies, como plantas, insectos, microorganismos, entre otros. Por este motivo, las muestras de ADN extraídas a partir de pelo fueron utilizadas como control positivo en las amplificaciones realizadas para medir la diversidad genética de esta especie.

En el caso de la extracción de ADN a partir de muestras de heces, se obtuvo una baja concentración debido a que las muestras colectadas eran muy pequeñas y probablemente contenían pocas células de *C. pygmaea*. Además, dichas muestras suelen contener inhibidores de la PCR, tales como sales biliares, ácidos húmicos y polisacáridos complejos, característicos de muestras de materia fecal (Bessetti, 2007), que impiden su utilización en estudios de este tipo (Chu, et al., 2006 y Creel, et al., 2003). Las amplificaciones realizadas con estas muestras, constataron que el ADN se encontraba parcialmente degradado, lo cual pudo haber ocurrido durante el proceso de extracción.

Los primers utilizados en este estudio fueron probados inicialmente por Nieto et al. (2011). Éstos fueron sintetizados en un principio para un estudio con la especie *Callithrix jacchus*, sin embargo también fueron probados en especies cercanas como *Callithrix pygmaea* y *Callimico goeldii* (Nievergelt, et al., 1998). A pesar de esto, no todos los primers dieron producto de amplificación a partir del ADN extraído a partir de muestras de heces de leoncillo. Como se mencionó anteriormente, el ADN puede haber estado degradado en ciertas regiones, por lo que amplificaba con ciertos primers y con otros no; también pudo verse afectado por falsos alelos y por fallas al amplificar los alelos correctos. Esto significa que al momento de amplificar una cierta región del ADN, solo se amplifica un alelo y el otro no, por lo que se crea un falso homocigoto. Estos errores pueden causar problemas en estudios genéticos, ya que un error en un genotipo multilocus puede crear un falso individuo al no amplificar un alelo en uno de los loci. Según Creel, et al. (2003), un genotipo de 10 loci tiene un 40% de probabilidad de albergar un error, lo cual quiere decir que en este estudio existe la probabilidad que se hayan tomado como individuos diferentes a genotipos que pudieron esconder un alelo que no fue amplificado. Esto puede resultar en una sobrestimación del número de animales vivos y crear la probabilidad de tomar como un individuo diferente al mismo individuo.

Se encontraron hasta 2 alelos en cada locus estudiado. Sin embargo, al extrapolar los resultados del presente estudio con aquellos del estudio de Nieto et al. (2011), se encontró un alelo adicional para el locus CJ-11, por lo que éste tendría un total de 3 alelos para las 3 poblaciones analizadas. El número reducido de alelos encontrados por locus (Tabla 5) sugiere una baja variabilidad genética de *C. pygmaea*. Sin embargo, el número reducido de

muestras y de grupos incluidos en este estudio pudo introducir un sesgo en los resultados. Existen 2 alelos privados para la población de San Pablo, lo cual muestra una mayor diversidad de alelos y una mayor variabilidad en esta población. Por el contrario, en Sehuaya existe una fijación de ciertos alelos, ya que 4 loci de los 5 amplificados resultaron ser monomórficos. Sin embargo, el reducido número de individuos analizados podría interferir y no reflejar el estado real de la población de Sehuaya.

En cuanto a la heterocigosis observada en este estudio, fue en general más alta que la esperada (Tabla 6 y Figura 8). En Sehuaya por ejemplo, el único locus en donde se esperaba una heterocigosis (por ser el único polimórfico), fue mayor a la esperada. En Sacha, la heterocigosis esperada en los loci CJ-7 y CJ-13 fue más baja que la heterocigosis observada. Por otro lado en el locus CJ-11, la heterocigosis observada fue 0 mientras que la esperada fue 0,278. Una reducción de la heterocigosis en un grupo podría sugerir un cierto nivel de endogamia. De acuerdo con Ruvolo (1997), las situaciones de cuello de botella en homínidos, en los que el número de individuos disminuía, provocaban una disminución de la variedad de alelos y un aumento de endogamia, originando individuos con genotipos monomórficos. En el estudio realizado por Nievergelt et al. (1998), se obtuvo una heterocigosis en *Callithrix jacchus* de 0,35 y resaltaron que existía un bajo nivel de variabilidad genética. En San Pablo, los loci CJ-7 y CJ-11 tuvieron una mayor heterocigosis observada comparada a la esperada. Solo en CJ-12, no hubo heterocigosis alguna. Los resultados vistos en Sehuaya, Sacha y San Pablo, concuerdan con los índices de fijación de los alelos (F) mencionados en la Tabla 6. En Sehuaya, 3 loci amplificados fueron monomórficos, esto muestra que existe una fijación de estos alelos, con excepción del locus

CJ-13 en el que todavía están presentes 2 alelos. En Sacha, los resultados sugieren que existe una diversidad más amplia gracias a que no existe tanto monomorfismo en los loci analizados. Por último en San Pablo, el índice de fijación de los alelos indica que hay fijación en un locus, mientras que en los otros 2 todavía hay un nivel medio de heterocigosis. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Gravitot et al. (2001) en tamarines león de cabeza dorada, especie que también ha pasado por un cuello de botella. En esta investigación se reportó una disminución de la diversidad genética, mientras que la heterocigosis observada tenía valores entre 0,34 y 0,65. Estos resultados y los del presente estudio coinciden con la teoría de Maruyama y Fuerst (1985), según la cual una población que pasa por un cuello de botella y sufre una disminución radical de individuos, posteriormente se mantiene en esta condición. Estos investigadores sugieren que primero se da una pérdida de alelos y después disminuye la heterocigosis. Como resultado, se produce un bajo número de alelos totales en la población, por la rápida desaparición de alelos no comunes.

Hay que tomar en cuenta que en el presente estudio y en el de Nieto et al. (2011) pudo haber habido una pérdida de alelos. Algunos estudios afirman que se necesita comprobar una homocigosis al menos siete veces, ya que puede haber un alelo que no se esté amplificando. Esto por supuesto supondría un aumento bastante grande del presupuesto (Creel, et al., 2003). Los casos en los que la heterocigosis observada fue más baja, pudieron haber sido consecuencia de que uno de los alelos no amplificó (Tabla 6). Según Creel, et al. (2003) y Janecka, et al. (2006), este es un caso muy común cuando se está trabajando con muestras no invasivas. Este tipo de error puede llevar a errores en el análisis de genotipos,

por lo que los individuos no estarían bien identificados. Para resolver este tipo de problemas, se sugiere realizar repeticiones de cada amplificación. (Chu, et al., 2006 y Creel, et al., 2003). Los resultados de este trabajo sugieren sin embargo que existe endogamia y fijación de alelos en la población de Sehuaya, por estar alejada geográficamente de las otras dos poblaciones. Además esta población es pequeña (el grupo 2 consta de solo 2 individuos) y hay más probabilidad de que exista endogamia. En las poblaciones de Sacha y San Pablo, sigue habiendo un cierto nivel de diversidad genética, al tener mínimo dos alelos en cada loci analizado y al obtener una heterocigosis observada más alta que la esperada. Sin embargo, faltaría analizar más loci del genoma de estos individuos para tener un panorama más claro de su situación.

El análisis de Hardy-Weinberg (Tabla 7) muestra que las poblaciones tienen regiones de ADN que revelan un cruce al azar entre los individuos de las poblaciones analizadas, mientras que otras regiones son monomórficas o no están en equilibrio Hardy-Weinberg. Según Frankham et al. (2002), la endogamia puede ser la causa del monomorfismo en ciertos loci en los cuales se pierde la variabilidad. Las poblaciones de Sehuaya y Sacha son las que más endogamia y pérdida de heterocigosis muestran al tener dos regiones monomórficas en su genoma. Falta obviamente un análisis más profundo de estas poblaciones, evaluando más regiones de su ADN, incluyendo a más individuos en el estudio y comparando más grupos de leoncillos en cada población.

El análisis de AMOVA (Tabla 8) sugiere que existe una variabilidad más alta dentro de cada población, que entre las poblaciones. Por este motivo, se realizó un análisis de coordenadas principales para todas las poblaciones y otro para cada población. En la Figura

8 se observa que la población de San Pablo forma dos grupos definidos, uno corresponde al grupo P4 y el otro a los grupos P1 y P2. Por otro lado, la población de Sehuaya forma un grupo menos definido, lejos de la población de San Pablo. La población de Sacha en cambio muestra semejanzas con ambas poblaciones, a pesar de estar alrededor de 30 kilómetros alejada de ellas. El análisis por población es diferente (Figuras 9, 10 y 11), en la población de Sehuaya se ve variabilidad en el grupo 1, mientras que en el grupo 2 no se puede concluir nada por solo tener un individuo en el estudio. Sin embargo, el grupo 1 y el grupo 2 están separados por el río Aguarico, un río grande que podría impedir un flujo génico entre grupos. La variabilidad genética en la población de Sacha es más alta debido a que es una población más grande. En la población de San Pablo en cambio se puede observar un grupo determinado correspondiente al grupo P4, mientras que los grupos P1 y P2 se ven dispersos y mezclados y unos con otros. Aquí de nuevo se necesitaría tener más muestras de los grupos 1 y 2 para poder concluir mejor sobre esta población pues son precisamente estos dos grupos los que mayores distancias genéticas presentaron en los análisis realizados por Nieto et al. (2011). Se puede concluir con este análisis que en la población de Sehuaya podría existir endogamia en ambos grupos debido a la distancia genética (2.124 con San Pablo y 0,168 con Sacha) y a la distancia geográfica que existe entre ésta población y las otras dos (Sehuaya está separada de Sacha y San Pablo por el río Peñayacu). Esta situación podría provocar una fijación de alelos y una baja variabilidad genética, debido a que la movilización de los individuos podría estar limitada. En la población de Sacha se podría sugerir que no existe ni endogamia ni una fijación de alelos, ya que la variabilidad genética que se observa en la Figura 10 sugiere un contacto entre los dos grupos de esta población e incluso probablemente migración de individuos entre

grupos. Por último, en la población de San Pablo podría existir un cierto índice de endogamia en el grupo 4, mientras que los grupos 1 y 2 parecen tener una variabilidad genética más alta y probablemente una migración de individuos más frecuente.

En cuanto a la distancia genética de Nei (Tabla 9), se observa una mayor semejanza entre las poblaciones de Sacha y Sehuaya. Lo cual sugiere que entre estas dos poblaciones existe (o existió hace mucho tiempo) cierto flujo génico. El flujo génico, aunque en menor grado, también podría explicar el por qué ciertas muestras de Sacha están cerca de las muestras de San Pablo. En las imágenes satélite de las áreas de las tres poblaciones se pueden encontrar todavía pequeños corredores de bosques de galería, que podrían usar los leoncillos para migrar entre poblaciones, aun cuando estas áreas están cada vez más afectadas por la deforestación. Al no conocer cómo se da la dispersión de los individuos de esta especie (cuál es la distancia promedio de dispersión, cuál es el éxito de dispersión) por el momento no se tiene otras líneas de evidencia que permita determinar si en realidad se está dando migración de individuos entre poblaciones y estimar el número de migrantes por generación (de la torre, et al., 2009).

Los resultados obtenidos sugieren que la población de Sacha puede estar apareándose con la población de San Pablo y la población de Sehuaya. La población de Sacha está separada por la población de San Pablo por el río Shushufindi, un río no muy grande que podría permitir el paso de los leoncillos de un lado a otro. Al mismo tiempo, la población de Sacha está separada de la población de Sehuaya por el río Peñayacu, el cual tampoco es un río grande. La Figura 9 muestra como ambos grupos de la población de Sacha tiene mucha semejanza genética tanto con los grupos 1 y 2 de la población de San Pablo, como con los

dos grupos de la población de Sehuaya. Es posible que la población de Sacha esté ocupando un área extensa. Estos individuos podrían estar apareándose con los individuos de otras poblaciones y así ampliando su diversidad genética. Sin embargo, todavía no hay un estudio sobre el alcance de dispersión de esta especie. Al parecer los leoncillos tienen una dispersión limitada debido a su pequeño tamaño y a la fragmentación de los bosques. Por este motivo, una posible explicación para esta migración aparente de individuos entre poblaciones podría ser su captura por parte de los humanos. Ellos los podrían estar transportando y acercándoles entre poblaciones, sobre todo entre Sacha y San Pablo donde hay variabilidad y cercanía genética (de la Torre, comunicación personal).

Se debe tomar en cuenta que las muestras colectadas pueden haber pertenecido a individuos emparentados (padres-hijos). Esto podría afectar en el análisis, ya que los alelos encontrados serían los mismos y se encontraría una menor diversidad genética. Para solucionar esta situación se deberían coleccionar muestras de individuos de una misma generación (Valle, Comunicación personal).

Un problema encontrado al momento de realizar el análisis estadístico, fue el bajo número de muestras de heces de las poblaciones estudiadas y el bajo número de primers utilizados en el análisis. En Sehuaya solo se encontraron 3 genotipos diferentes en el grupo 1 y 1 genotipo en el grupo 2. Mientras que estos grupos constaban de 10 individuos en el grupo 1 y 2 individuos en el grupo 2 (de la Torre, comunicación personal). Es posible que si se usan más primers, más genotipos puedan ser identificados dentro de las muestras que fueron colectadas. Además, se comprendería mejor la cercanía genética y la relación entre grupos y entre poblaciones. Esta información sería útil para definir planes de conservación en las

poblaciones que todavía tienen una buena variabilidad genética y que todavía se puede evitar una posible pérdida de alelos causado por el impacto humano.

10. Conclusiones

- Este es un estudio preliminar que trata de determinar la diversidad genética de una limitada región del genoma de *C. pygmaea* en las poblaciones de Sehuaya y Sacha.
- Existe una variabilidad genética más alta en una misma población, que entre diferentes poblaciones. Esto indica una mayor reproducción entre individuos de una misma población, y poca migración de individuos entre poblaciones.
- Los resultados sugieren que las poblaciones de Sehuaya, Sacha y San Pablo podrían estar conectadas y que existe o ha existido una migración de individuos entre poblaciones, la cual puede ser explicada por la captura de individuos por los humanos de la zona.
- Actualmente las poblaciones, e incluso grupos de una misma población están aislados entre si, por lo que se podría sugerir que ha aumentado la endogamia y el efecto de deriva génica, reduciendo la variabilidad genética de cada grupo.

11. Recomendaciones

- Se recomienda hacer un estudio más amplio con mayor número de muestras de leoncillo, más grupos de cada población y más marcadores SSR para obtener resultados más reales de la situación genética de *Callithrix pygmaea*.
- Para aumentar la confiabilidad del estudio, y comprobar que no hayan alelos perdidos (falsos homocigotos) y que los alelos que se están tomando en cuenta son

reales, se deberían realizar 7 repeticiones de cada amplificación. Esto supondría un aumento en los costos del estudio, por lo que esto sería más conveniente hacerlo en un estudio más extenso (más grupos individuos de cada población y más primers), en el que los resultados proporcionen una visión más amplia y real de la situación de *C. pygmaea* (Creel, et.al., 2003).

12. Bibliografía

Alberts, C.C.; Ribeiro-Paes, J.T.; Aranda-Salveiro, G.; Cursino-Santos, J.R.; Moreno-Cotulio, V.R.; Oliveira, A.L.D.; Porchia, B.F.M.M.; Santos, W.F. y Souza, E.B. (2010) “DNA extraction from hair shafts of wild Brazilian felids and canids”. *Genetics and Molecular Research* 9 (4): 2429-2435.

Halima Benbouza, Jean-Marie Jacquemin, Jean-Pierre Baudoin et Guy Mergeai. (2006) «Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels», *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, volume 10 número 2 : 77-81
<http://popups.ulg.ac.be/Base/document.php?id=1128>

Bessetti, Joseph. (2007). “An introduction tu PCR inhibitors”. Profiles in DNA – March. PROMEGA.

Bjornerfeldt, Susanne y Vila, Carles. (2006). “Evaluation of methods for single hair DNA amplification”. *Conservation Genetics* 8: 977–981 DOI 10.1007/s10592-006-9220-z. Springer Science Business Media B.V.

Cawthon Lang KA. (2005) Primate Factsheets: Pygmy marmoset (*Callithrix pygmaea*) Taxonomy, Morphology, & Ecology.
<http://pin.primate.wisc.edu/factsheets/entry/pygmy_marmoset>. Accessed 2012 August 30.

Chaves P., Alvarenga C., Possamai C., Dias L., Boubli J., Strier K., Mendes S. y Fagundes V. (2011) “Genetic Diversity and Population History of a Critically Endangered Primate, the Northern Muriqui (*Brachyteles hypoxanthus*)”. *Plos One*. June 2011. Volume 6, Issue 6, e20722.

Chu, Jui-Hua; Lin Yao-Sung y Wu, Hai-Yin. (2006) “Applicability of Non-Invasive Sampling in Population Genetic Study of Taiwanese Macaques (*Macaca cyclopis*)”. *Taiwania*, 51(4): 258-265, 2006.

Creel S., Spong G., Sands J., Rotella J., Zeigle J., Joe L., Murphy K. y Smith D. (2003). "Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes". *Molecular Ecology* **12**, 2003–2009 doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01868.

de la Torre, Stella; Yépez, Pablo; Snowdon, Charles T.; Pyaguaje, Alfredo. (2005) "Ecología, Comportamiento y Conservación del leoncillo *Callithrix (Cebuella) pygmaea* EN TIERRAS SECOYA".

de la Torre S., Yépez P. y Snowdon C. (2009) "Conservation Status of Pygmy Marmosets (*Cebuella pygmaea*) in Ecuador". S.M. Ford et al. (eds.), *The Smallest Anthropoids*, Developments in Primatology: Progress and Prospects, DOI 10.1007/978-1-4419-0293-1_22, © Springer Science+Business Media.

Digby, Leslie J.; Ferrari, Stephen F. y Saltzman, Wendy. (2005) "Callitrichines. The Role of Competition in Cooperatively Breeding Species". PIPC02b 11/7/05 Page 104.

Fahrig, Lenore. (2003) "Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity". *Annu. Rev. Ecol. Evol.* **34**:487–515.

Frankham, R., Ballou, J. D. y Briscoe, D. A. (2002) "Introduction to Conservation Genetics". Cambridge University Press. New York.

González E. (2003) "Microsatélites: Sus Aplicaciones en la Conservación de la Biodiversidad". *Graellsia*, **59**(2-3): 377-388.

Gravitol A.D., Ballou J.D. y Fleischer R.C. (2001) "Microsatellite variation within and among recently fragmented populations of the golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*)" *Conservation Genetics* **2**: 1–9. © 2001 Kluwer Academic Publishers.

Jimenes J.M., Simoes, A.L. y De Jong D. (2005) "Allele frequencies and genetic diversity in two groups of wild tufted capuchin monkeys (*Cebus apella nigrurus*) living in an urban forest fragment". *Online Journal: Genetics and Molecular Research* **4** (4): 832-838 ISSN-1676-5680.

Kumar, Ashwani (2001) "Transformation and Molecular Markers". School of Biotechnology, Devi Ahilya University Indore-452001, INDIA In *Plant Genetic*. ISBN: ISBN13: 978-81-7132-613-6

Maruyama, T y Fuerst, P. (1985). "Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics". *The Genetics Society of America* **111**: 675-689.

McGarigal, Kevin; Romme, William; Crist, Michele y Roworth, Ed. (2001) "Cumulative effects of roads and logging on landscape structure in the San Juan Mountains, Colorado (USA)". *Landscape Ecology* **16**: 327–349.

Muriel, Priscilla. (2008) “La diversidad de Ecosistemas en el Ecuador”. Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Herbario QCA & Herbario AAU. Quito & Aarhus. 28-38.

Nievergelt C., Mundy N. y Woodruff D. (1998) “Microsatellite primers for genotyping common marmosets (*Callithrix jacchus*) and other callitrichids”. Blackwell Science Ltd, Molecular Ecology, 7, 1431-1439.

Nieto D., de la Torre S., Arahana V., Torres L. y Troya, A.M. (2011) “A preliminary study of genetic diversity of pygmy marmoset *Callithrix pygmaea* (Primates: Cebidae: Callitrichinae) using Short Sequence Repeats (SSR)”. Neotropical Primates. Vol 18. Num 1. Pag 25-27.

Olivieira Eder Jorge, Gomes Pádua Juliano, Zucchi Maria Inmaculada, Vencovsky Roland y Carneiro Vieira Maria Lúcia. (2006) “Origin, evolution and genome distribution of microsatellites”. Genetics and Molecular Biology, 29, 2, 294-307.

Peakall, Rod y Smouse, Peter. (2010) GenAlex 6.4 - Appendix 1–Methods and Statistics in GenAlex 6.4.

Piñero, D. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 437-494.

Ruvolo, M. (1997). “Genetic diversity in Hominoid Primates”. Annual Review of Anthropology 26. 515-40.

Tagliaro C, Cruz M.P., Schneider H., Sampaio I y Stanhope M. (2000) “Molecular studies of *Callithrix pygmaea* (Primates, Platyrrhini) based on transferrin intronic and ND1 regions: implications for taxonomy and conservation”. Genetics and Molecular Biology, 23, 4, 729-737.

Tirira, D. G. (2011). *Libro Rojo de los mamíferos del Ecuador*. 2a edición. Versión 1. Fundación Mamíferos y Conservación, Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Ministerio del Ambiente del Ecuador. Quito.

Townsend, Wendy. (2001) “*Callithrix pygmaea*”. Mammalian Species. The American Society of Mammalogists.. No. 665, pp. 1-6.

Waits L. y Peatkau D. (2005) “Noninvasive Genetic Sampling Tools for Wildlife Biologists: A Review of Applications and Recommendations for Accurate Data CollectionAuthor”. The Journal of Wildlife Management, Vol. 69, No. 4 (Oct., 2005), pp. 1419-1433

1. Tablas

Tabla 1. Concentración de ADN en ng/uL de las muestras de Sehuaya del grupo 1 (S1.1 a S1.13) y del grupo 2 (S2.1 a S2.15). También se muestra el promedio de concentración de ADN de las muestras de cada grupo, siendo 10,43 ng/uL para el grupo 1 y 3,54 ng/uL para el grupo 2.

SEHUAYA		
Muestras	[] ADN (ng/uL)	Promedio [] (ng/uL)
S1.1	1,5	10,44
S1.2	4,8	
S1.3	1,5	
S1.4	9,8	
S1.5	9,6	
S1.6	12,2	
S1.7	3,6	
S1.8	10,3	
S1.9	12,8	
S1.10	17,7	
S1.11	26,3	
S1.12	3,5	
S1.13	22,1	
S2.1	1,2	3,55
S2.2	3,4	
S2.3	2,8	
S2.4	1,9	
S2.5	0,7	
S2.6	3,5	
S2.7	0,7	
S2.8	6,5	
S2.9	1,7	
S2.10	7,5	
S2.11	0,8	
S2.12	3,9	
S2.13	0,7	
S2.14	14,8	
S2.15	3,1	

Tabla 1. Concentración de ADN en ng/uL de las muestras de Sacha del grupo 1 (Sa1.1 a Sa1.9) y del grupo 2 (Sa2.1 a Sa2.9). También se muestra el promedio de concentración de ADN de las muestras de cada grupo, siendo 4,34 ng/uL para el grupo 1 y 3,56 ng/uL para el grupo 2.

SACHA		
Muestras	[] ADN (ng/uL)	Promedio [] (ng/uL)
Sa1.1	2,5	4,34
Sa1.2	0,7	
Sa1.3	1,4	
Sa1.4	1,2	
Sa1.5	18,5	
Sa1.6	11,4	
Sa1.7	1,2	
Sa1.8	1,1	
Sa1.9	1,1	
Sa2.1	2	3,56
Sa2.2	5	
Sa2.3	1,5	
Sa2.4	10,1	
Sa2.5	7,6	
Sa2.6	1,4	
Sa2.7	2,5	
Sa2.8	2,2	
Sa2.9	1,8	

Tabla 2. Concentración de ADN de las muestras de pelo que formaron parte de la estandarización del protocolo de extracción de ADN a partir de pelo de *C. pygmaea*.

	# pelos	[] (ng/ul)	260/280
1	5	4,4	2,9
2	10	5,5	2,5
3	15	12,1	1,18
4	5	6,5	1,44
5	10	5,2	1,37
6	15	11	1,25
7	10	9,5	1,27
8	15	10,7	1,1
9	10	10	1,25
10	15	9,2	1,3
11	15	24,1	1,61
12	15	37,3	1,71
13	15	22,4	1,66
14	15	47,1	1,67

Tabla 3. Genotipo de cada individuo de las tres poblaciones de leoncillos: Sehuaya (SE), Sacha (SA) y San Pablo (SP). Los tamaños los alelos en cada locus de los individuos se encuentran en pares de bases (pb).

Individuos	Población	Primers									
		CJ-7 (pb)		CJ-11 (pb)		CJ-12 (pb)		CJ-13 (pb)		CJ-14 (pb)	
S 1.4	SE	126	126	112	112	0	0	273	273	0	0
S 1.5	SE	126	126	0	0	0	0	0	0	128	128
S 1.13	SE	126	126	112	112	0	0	257	273	0	0
S 2.14	SE	126	126	0	0	0	0	0	0	128	128
Sa 1.1	SA	126	126	0	0	165	165	0	0	0	0
Sa 1.2	SA	126	126	0	0	0	0	273	273	0	0
Sa 1.3	SA	126	126	112	112	165	165	273	273	0	0
Sa 1.5	SA	118	126	112	112	0	0	273	273	128	128
Sa 1.6	SA	118	126	112	112	0	0	257	273	128	128
Sa 2.1	SA	126	126	0	0	165	165	273	273	0	0
Sa 2.2	SA	118	126	120	120	0	0	273	273	128	128
Sa 2.3	SA	126	126	112	112	0	0	0	0	0	0
Sa 2.4	SA	118	126	112	112	0	0	273	273	128	128
Sa 2.6	SA	118	126	0	0	165	165	257	273	0	0
Sa 2.8	SA	0	0	0	0	165	165	273	273	0	0
P1-B	SP	0	0	0	0	165	165	0	0	0	0
P1-G	SP	118	0	0	0	165	165	0	0	0	0
P1-H	SP	0	0	0	0	165	165	0	0	0	0
P2-A	SP	118	126	0	0	165	165	0	0	0	0
P2-F	SP	0	0	0	0	165	165	0	0	0	0
P2-J	SP	0	0	0	0	132	132	0	0	0	0
P42-B	SP	118	118	120	120	165	165	0	0	0	0
P42-C	SP	118	118	120	142	165	165	0	0	0	0
P42-E	SP	118	126	120	142	165	165	0	0	0	0
P42-G	SP	118	126	120	120	165	165	0	0	0	0
P42-H	SP	0	0	0	0	165	165	0	0	0	0
P43-D	SP	0	0	120	120	165	165	0	0	0	0
P43-E	SP	0	0	120	120	165	165	0	0	0	0
P43-J	SP	118	126	0	0	165	165	0	0	0	0

Tabla 4. Frecuencias alélicas de cada locus, por población de leoncillos (SA: Sacha, SE: Sehuaya y SP: San Pablo). Se observa que los alelos 142 del locus CJ-11 y el 132 del locus CJ-12, son alelos privados (a.p.) para la población de San Pablo.

Locus	Alelos (pb)	SE	SA	SP
CJ-7	118	0,000	0,250	0,667
	126	1,000	0,750	0,333
CJ-11	112	1,000	0,833	0,000
	120	0,000	0,167	0,833
	142	0,000	0,000	0,167 (a.p.)
CJ-12	132	0,000	0,000	0,071 (a.p.)
	165	0,000	1,000	0,929
CJ-13	257	0,250	0,111	0,000
	273	0,750	0,889	0,000
CJ-14	128	1,000	1,000	0,000

Tabla 5. Heterocigosis observada y esperada en cada población de *C. pygmaea*: Sehuaya (SE), Sacha (SA) y San Pablo (SP). En esta tabla está descrita el tamaño de la muestra (N), el número de alelos (Na), el número de alelos efectivos (Ne), la heterocigosis observada (Ho), la heterocigosis esperada (He) y el índice de fijación de alelos (F).

Población	Locus	N	Na	Ne	Ho	He	F
SE	CJ-7	4	1,000	1,000	0,000	0,000	#N/A
	CJ-11	2	1,000	1,000	0,000	0,000	#N/A
	CJ-12	0	0,000	0,000	0,000	0,000	
	CJ-13	2	2,000	1,600	0,500	0,375	-0,333
SA	CJ-14	2	1,000	1,000	0,000	0,000	#N/A
	CJ-7	10	2,000	1,600	0,500	0,375	-0,333
	CJ-11	6	2,000	1,385	0,000	0,278	1,000
	CJ-12	5	1,000	1,000	0,000	0,000	#N/A
	CJ-13	9	2,000	1,246	0,222	0,198	-0,125
SP	CJ-14	4	1,000	1,000	0,000	0,000	#N/A
	CJ-7	6	2,000	1,800	0,667	0,444	-0,500
	CJ-11	6	2,000	1,385	0,333	0,278	-0,200
	CJ-12	14	2,000	1,153	0,000	0,133	1,000
	CJ-13	0	0,000	0,000	0,000	0,000	
	CJ-14	0	0,000	0,000	0,000	0,000	

Tabla 6. Análisis Hardy-Weinberg para las tres poblaciones de leoncillos: Sehuaya (SE), Sacha (SA) y San Pablo (SP). Se puede diferenciar valores n.s. (no significativos) y valores * (significativos, $p < 0.05$). Además se encuentran los valores del chi cuadrado, grados de libertad (DF) y la probabilidad (p).

Población	Locus	ChiSquare	DF	Prob	Observación
SE	CJ-7	1,111	1	0,292	n.s.
	CJ-11	6,000	1	0,014	*
	CJ-12	Monomórfico			
	CJ-13	0,222	1	0,637	n.s.
	CJ-14	Monomórfico			
SA	CJ-7	1,111	1	0,292	n.s.
	CJ-11	6,000	1	0,014	*
	CJ-12	Monomórfico			
	CJ-13	0,141	1	0,708	n.s.
	CJ-14	Monomórfico			
SP	CJ-7	1,5	1	0,221	n.s.
	CJ-11	0,24	1	0,624	n.s.
	CJ-12	14	1	0	*

Tabla 7. Análisis AMOVA para las tres poblaciones de leoncillos (Sacha, Sehuaya y San Pablo). Se puede observar la varianza existente entre poblaciones y dentro de una población, mientras se describe los grados de libertad (df), la suma de los cuadrados (SS), el modelo de los cuadrados (MS) y la variación estándar (Est. Var.).

	df	SS	MS	Est. Var.	%
Entre poblaciones	2	48,786	24,393	2,404	42%
En la población	26	86,834	3,340	3,340	58%
Total	28	135,621		5,744	100%

Tabla 8. Distancia genética de Nei entre las tres poblaciones de leoncillos (Sacha, Sehuaya y San Pablo). El cuadrado azul muestra la distancia genética entre Sacha y Sehuaya, en verde la distancia genética entre Sacha y San Pablo y en amarillo la distancia genética entre Sehuaya y San Pablo. Se puede observar una gran distancia genética entre las poblaciones de Sehuaya y San Pablo, mientras que una pequeña distancia genética entre las poblaciones de Sacha y Sehuaya.

Sacha	Sehuaya	San Pablo	
0,000			Sacha
0,168	0,000		Sehuaya
0,698	2,124	0,000	San Pablo

2. Figuras

Figura 1. Gel de agarosa al 1% en el que se corrió las muestras de ADN extraído del grupo 1 de Sehuaya. En esta figura se pueden diferenciar el ladder y las muestras de la 1 a la 14 (S1.1 a S1.14).

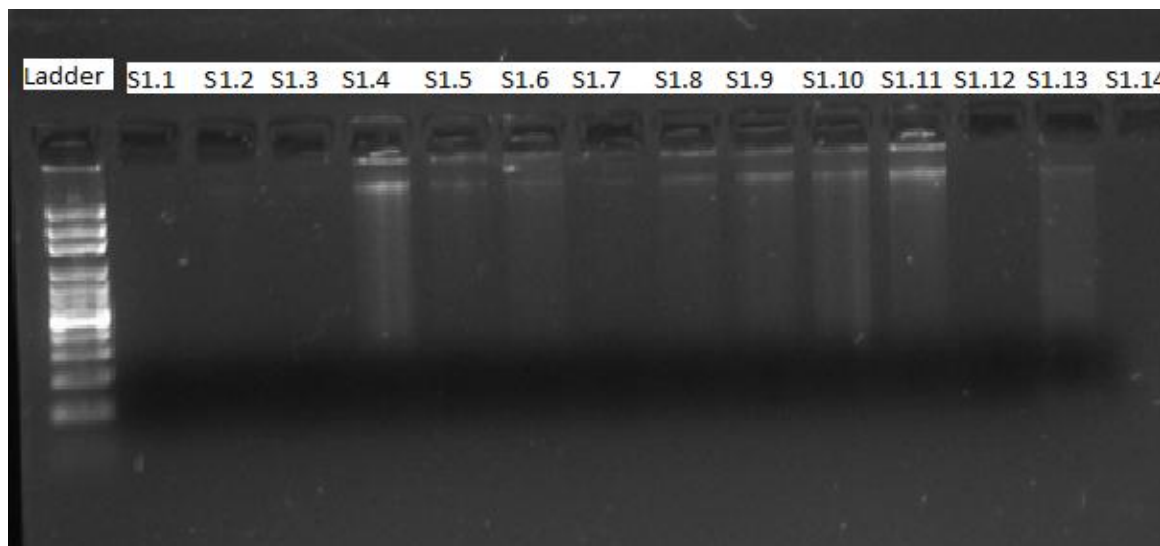


Figura 2. . Gel de agarosa al 1% en el que se corrió las muestras de ADN extraído del grupo 2 de Sehuaya. En esta figura se pueden diferenciar el ladder y las muestras de la 1 a la 15 (S2.1 a S2.15).

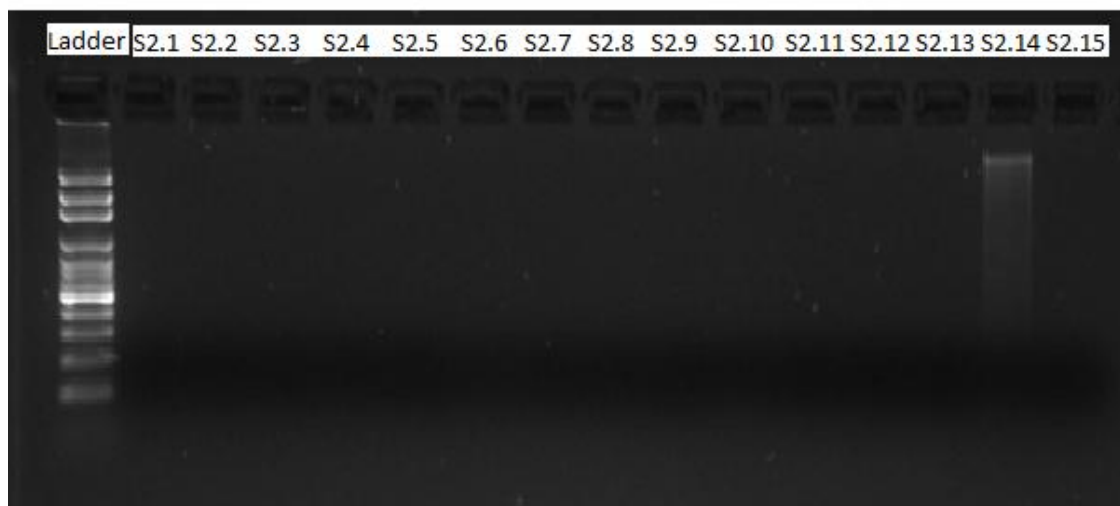


Figura 3. . Gel de agarosa al 1% en el que se corrió las muestras de ADN extraído de los 2 grupos la población de Sacha. En esta figura se pueden diferenciar el ladder, las muestras del grupo 1 de la 1 a la 9 (Sa1.1 a Sa1.9) y del grupo 2 de la 1 a la 9 (Sa2.1 a Sa2.9)

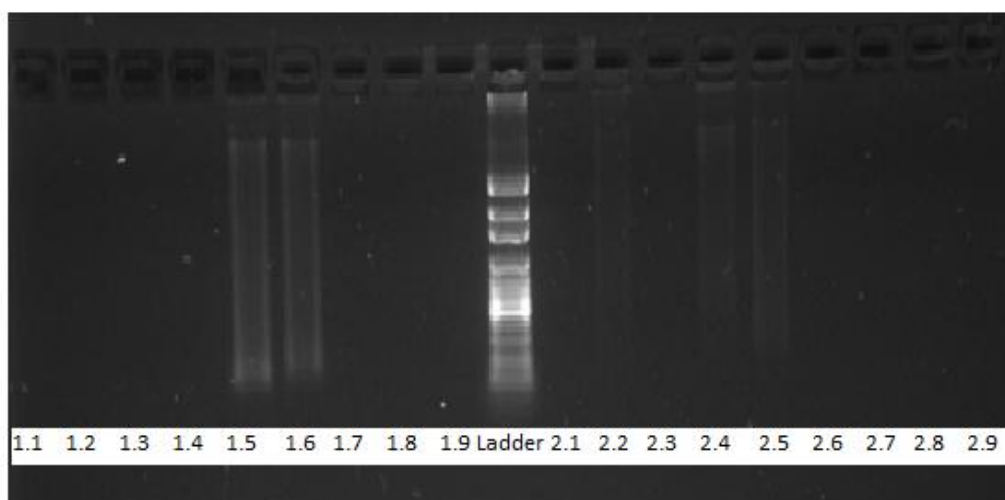


Figura 4. Gel de Poliacrilamida donde se observa la amplificación de muestras de ADN extraído a partir de pelo con todos los primers utilizados en este estudio: CJ-6, CJ-7, CJ-10, CJ-11, CJ-12, CJ-13 y CJ-14. Se observa también el tamaño de las bandas obtenidas para cada locus.

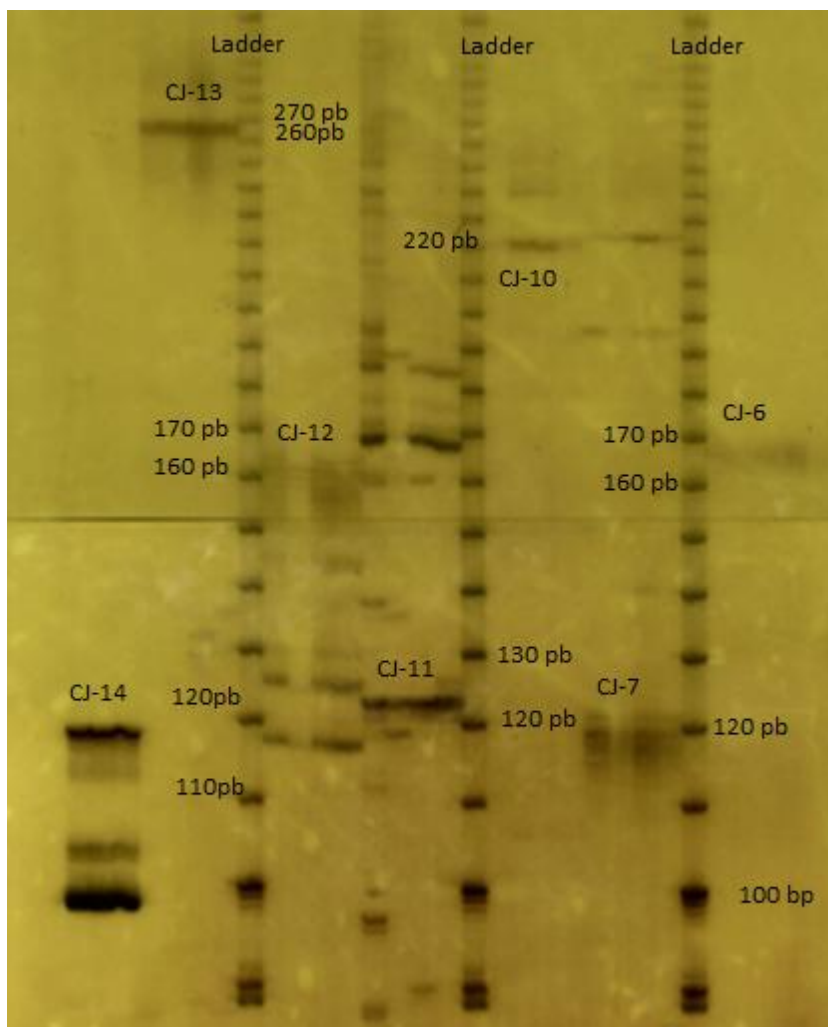


Figura 5. Gel de Poliacrilamida de las muestras amplificadas con el primer CJ-7 de las poblaciones de Sehuaya y Sacha. Se amplificaron dos muestras de ADN extraído a partir de pelo de leoncillo, 7 muestras del grupo 1 de Sehuaya (S1.4, S1.5, S1.6, S1.8, S1.9, S1.12, S1.13), 1 muestra del grupo 2 de Sehuaya (S2.14), 9 muestras del grupo 1 de Sacha (Sa1.1 a Sa1.9) y 9 muestras del grupo 2 de Sacha (Sa2.1 a Sa2.9).

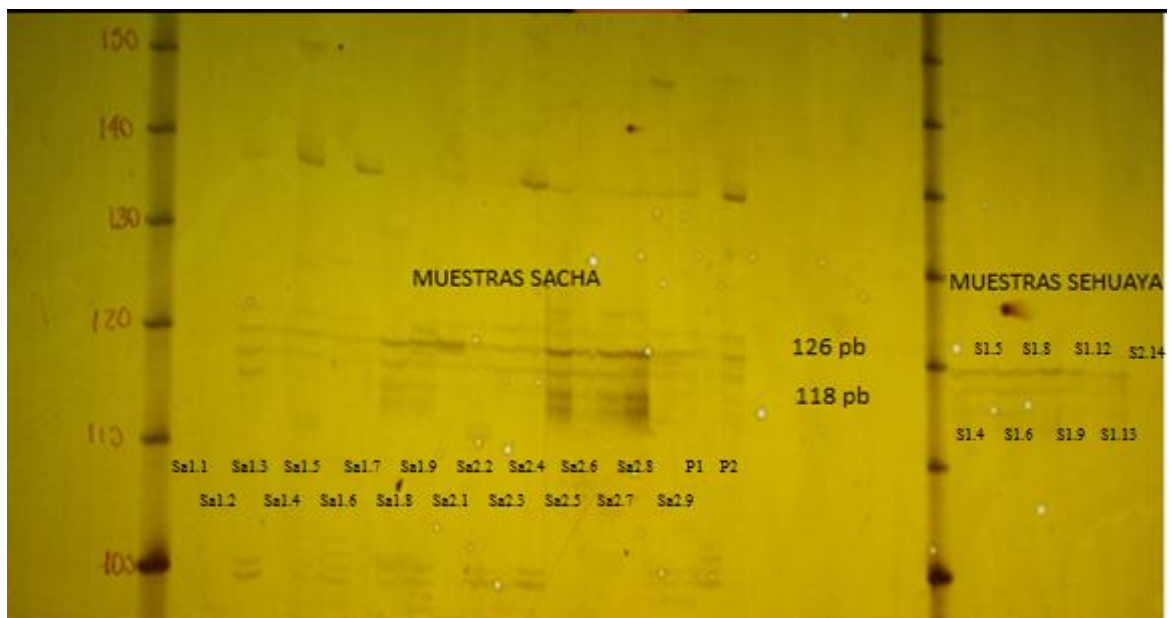


Figura 6. Gel de Poliacrilamida de las muestras amplificadas con el primer CJ-11 de las poblaciones de Sehuaya y Sacha. Se amplificaron dos muestras de ADN extraído a partir de pelo de leoncillo, 7 muestras del grupo 1 de Sehuaya (S1.4, S1.5, S1.6, S1.8, S1.9, S1.12, S1.13), 1 muestra del grupo 2 de Sehuaya (S2.14), 9 muestras del grupo 1 de Sacha (Sa1.1 a Sa1.9) y 9 muestras del grupo 2 de Sacha (Sa2.1 a Sa2.9).

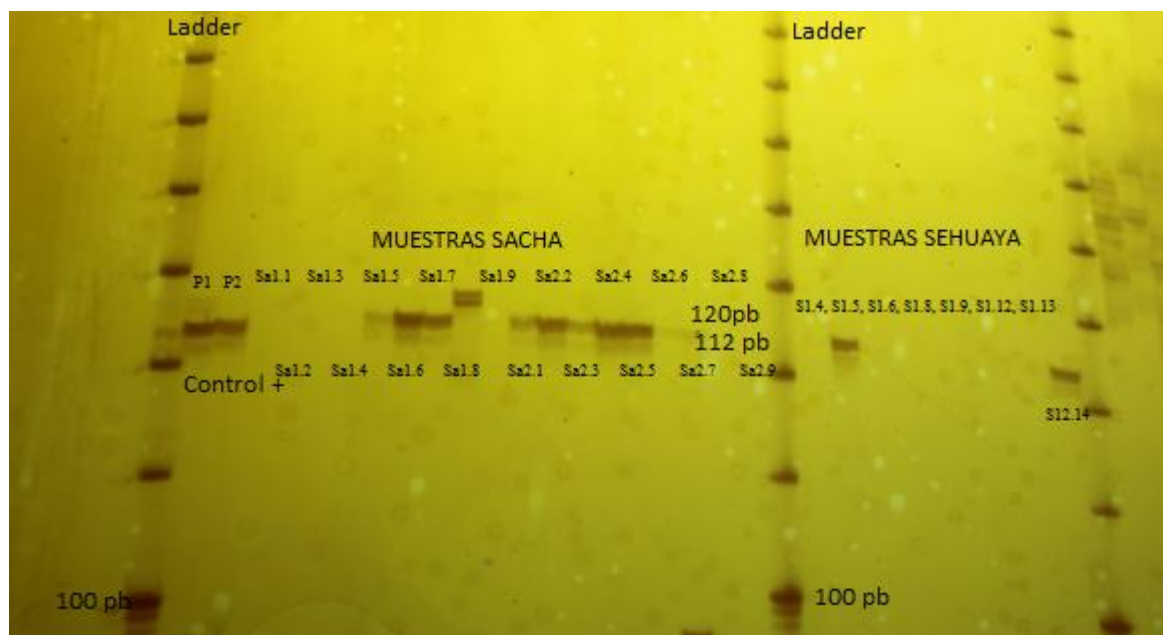


Figura 7. Gel de Poliacrilamida de las muestras amplificadas con el primer CJ-13 de las poblaciones de Sehuaya y Sacha. Se amplificaron dos muestras de ADN extraído a partir de pelo de leoncillo, 7 muestras del grupo 1 de Sehuaya (S1.4, S1.5, S1.6, S1.8, S1.9, S1.12, S1.13), 1 muestra del grupo 2 de Sehuaya (S2.14), 9 muestras del grupo 1 de Sacha (Sa1.1 a Sa1.9) y 9 muestras del grupo 2 de Sacha (Sa2.1 a Sa2.9).



Figura 8. Heterocigosis esperada (He) versus Heterocigosis observada (Ho) en cada locus analizado (CJ7, CJ-11 y CJ-13) para las poblaciones estudiadas, Sehuaya (SE), Sacha (SA) y San Pablo (SP).

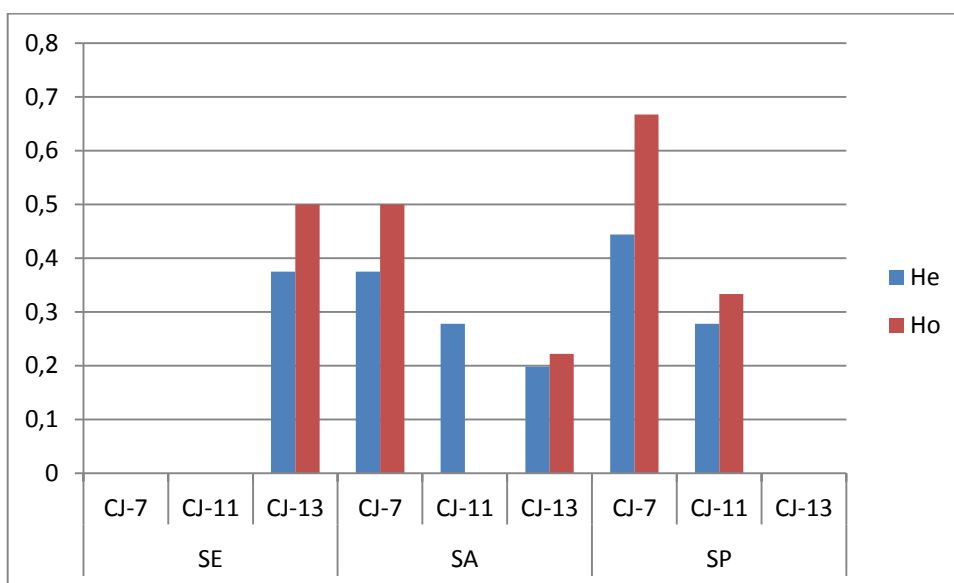


Figura 9. Análisis de Coordenadas Principales que muestra patrones de variabilidad de las tres poblaciones de leoncillos. Se puede observar que las muestras de la población de Sehuaya (SE) no están agrupadas. La población de San Pablo (SP) forma 2 grupos claros, mientras que la población de Sacha (SA) es más variable y tiene muestras cercanas a un grupo de la población de San Pablo y a muestras de la población de Sehuaya.

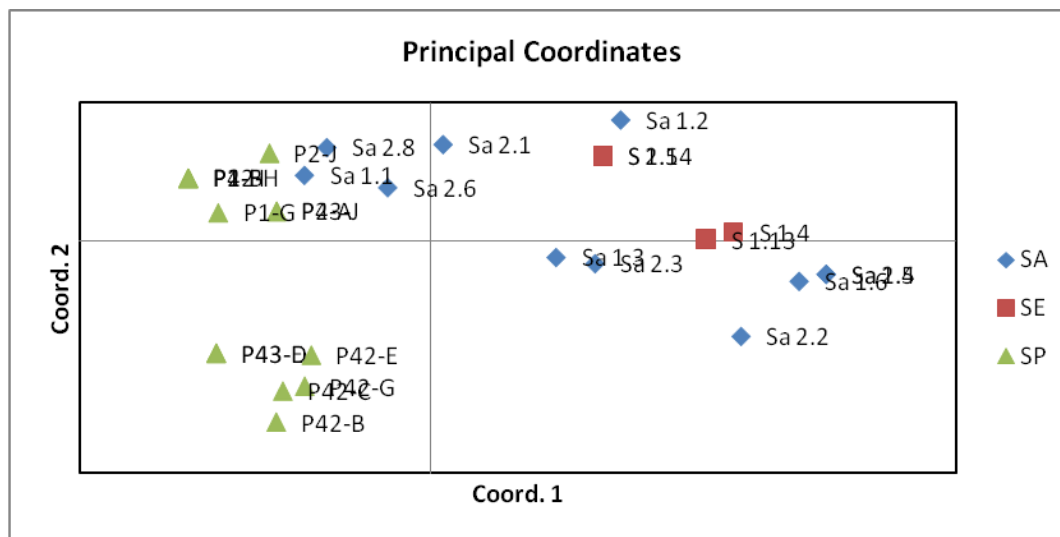


Figura 10. Análisis de Coordenadas Principales de la Población de Sehuaya. Se puede observar que las muestras del grupo 1 de esta población están esparcidas por el plano y la muestra del grupo 2 es muy cercana a una de las muestras del grupo 1.

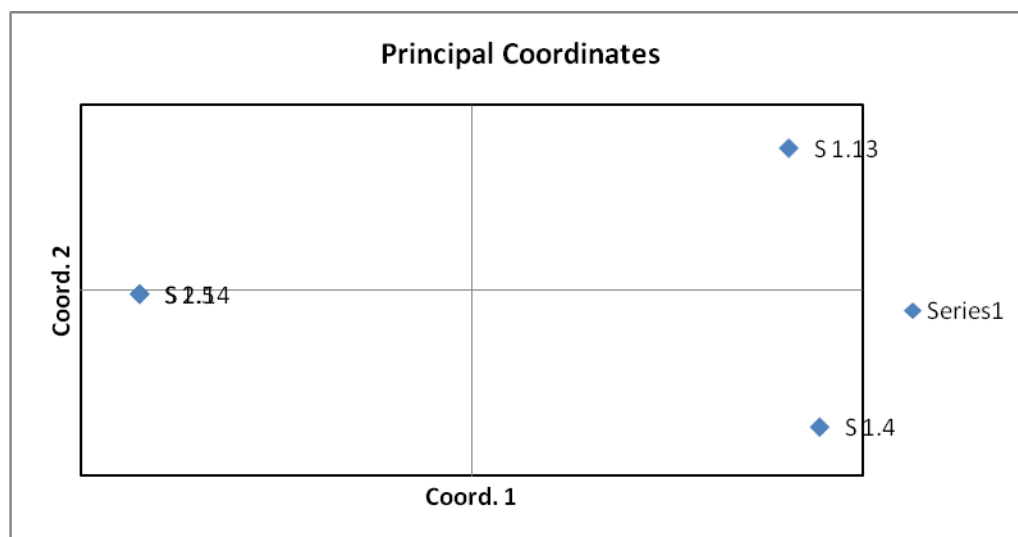


Figura 11. Análisis de Coordenadas Principales de la Población de Sacha. Se puede observar que las muestras de los 2 grupos de esta población no forman un patrón determinado en el que las muestras de un mismo grupo están más relacionadas. Por el contrario, tienen similitudes genéticas entre las muestras de los 2 grupos.

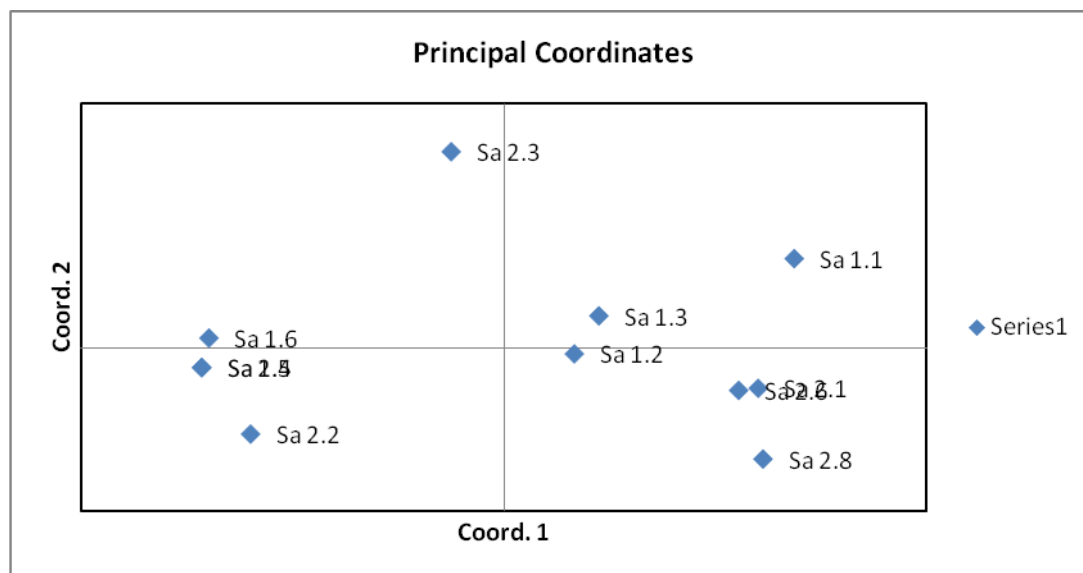
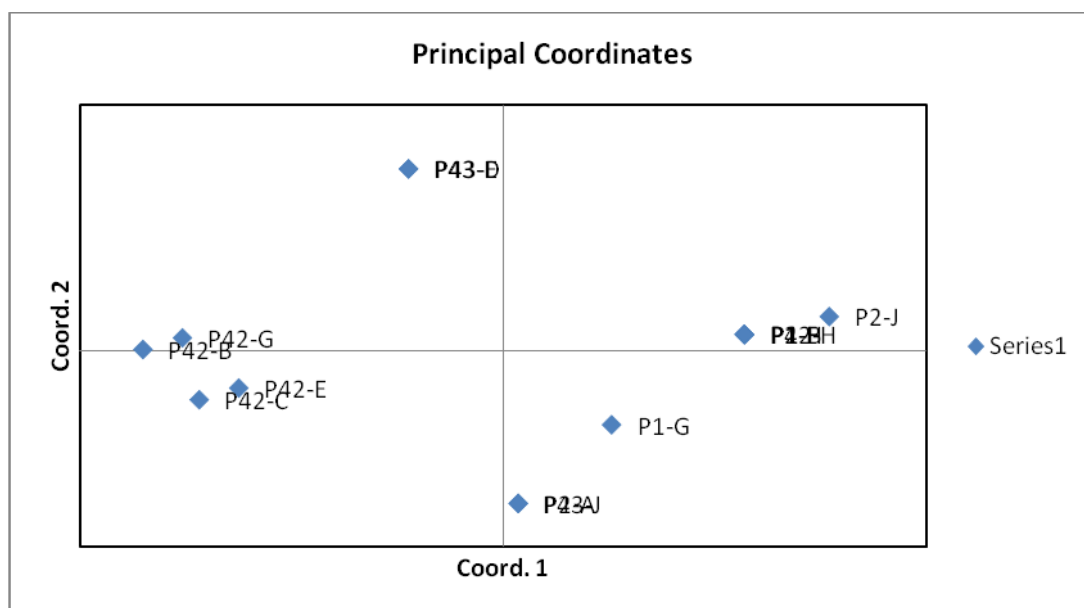


Figura 12. Análisis de Coordenadas Principales de la Población de San Pablo. En esta población se puede diferenciar un grupo determinado que lo forman algunas muestras del grupo 4. Las muestras de los grupos 1 y 2 están esparcidas por el plano.



14. Anexos

Anexo 1. Primers utilizados para realizar el estudio de diversidad genética de las poblaciones de Sehuaya y Sacha (Nievergelt, et. al., 1998).

Locus	Repeat motif	Primer sequences (5'-3')
CJ1	(CA) ₂₁	AGCATGGCACTTTGTTTTCT GCAACAGAGCAACTGCAT
CJ6	(CA) ₁₇	ATCATTGTGCACTCTATGCATGT AGAATGAAAAACATGGAAAGGC
CJ7	(CA) ₁₃	TCTCTTCCATGAAGCCTTCAA GGTTGCTATTTGCCAAGCAT
CJ10	(CA) ₁₉	GAGCCAAGATTATGCCGTT TGTGTAAGGAGGATTTGTGTTG
CJ11	(CA) ₁₁	GATCCTGGGATGCAOCTG GAATGCTGCATTGATTTAGGGA
CJ12	(CA) ₉	GCTCCAAGGAACTGTTAGAACC TGATGGTGCATTCTTAGAGGG
CJ13	(CA) ₁₃ (TC) ₁₄	CAAGGAAACATAAGTGTGGCTC CAGACATTTTAGCCCCCTCC
CJ14	(TC) ₂₁ (CA) ₅	CTTGTGACAGTGGGGGAGTT CAAGTGTGAACATCCATGCC
CJ15	(CA) ₁₃	CCATCCTGAGCAACAGGG GAGTGAGCTTGAATTTCAACCC